MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1950 - 1951

TOMO XXIII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

As "MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" são destinadas à publicação de trabalhos realizados no Instituto ou com a sua contribuição. Os trabalhos são dados à publicidade, separadamente, logo após a entrega e reunidos anualmente num volume.

Serão fornecidas, a pedido, separatas dos trabalhos publicados nas "Memorias", pedindo-se nesse caso o obsequio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Toda a correspondencia editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa Postal, 65
S. Paulo, BRASIL.

PEDE-SE PERMUTA
EXCHANGE DESIRED.

ÍNDICE

VITAL BRAZIL

* 28 de Abril de 1865
† 8 de Maio de 1950

VITAL BRAZIL

Entre as mais elevadas manifestações de nobreza da inteligência sempre há de se destacar o cumprimento do dever filial que manda louve a Criatura seu Criador.

Vital Brazil e Instituto Butantan são dois nomes indissoluvelmente entrelaçados na história do progresso das ciências médicas, não havendo como citar um sem recordar o outro. Ao sair à luz o primeiro volume destas Memórias depois do desaparecimento do fundador desta Instituição e de sua tradicional publicação, vem o Butantan prantear-lhe a perda, citá-lo como exemplo dignificante para as gerações futuras e afirmar que a sua lembrança servirá sempre de estímulo aos continuadores da obra por êle iniciada.

Relembrar os trabalhos de pesquisa dêsse pioneiro é rememorar a solução de um dos mais empolgantes problemas da Medicina Tropical, tão antigo como a própria história da humanidade.

Em todas as idades, como em todas as civilizações que perpassaram a superfície da terra, constituiu sempre objeto de profunda curiosidade e de justificado terror êsse poder extranho, conferido pela natureza a certas de suas criaturas, de capturar a presa ou de se defender do inimigo pela inoculação súbita de veneno mortal.

E a história e a lenda, e a mitologia e a Biblia, e o fetichismo e o alquimismo, e a superstição e o empirismo, no decorrer dos séculos, dele se ocupam ou se preocupam em neutralizar essa maléfica virtude, esbarrando sempre numa mesma barreira de aparência intransponível.

E a morte prossegue com técnica de surpresa que aterroriza: criança e adulto, rico e pobre, homem e mulher, no apogeu da vitalidade, chocantemente, bruscamente, sem um aviso prévio, são condenados à morte, como por um passe de mágica, deixado para traz um rasto de dor e de perplexidade.

E aqueles que têm por missão a cura dos males dos seus semelhantes curvam as frontes, impotentes ante o malôgro dos seus esforços e a inutilidade da sua ciência diante dêsse dom terrivel, mais parecendo sobrenatural, que derruba o homem na plenitude de sua força ou a criança na plenitude de sua promessa.

Ao apagar-se o Século da Luz, um dêsses abnegados lutadores, clínico da roça, provou também por mais de uma vez o fel da derrota, mas não se curvou

ante ela. Vencido uma primeira e uma segunda vez, compreendeu ser preciso mudar de tática e estudar a do inimigo. E a êsse estudo dedicou a vida.

Por uma dessas coincidências benéficas encontraram-se os dois fatores indispensáveis à resolução do problema: a época do amadurecimento científico e o homem preocupado com a solução.

Behring funda a soroterapia antitóxica, Roux a consolida. Calmette, em analogia feliz, identifica a peçonha animal à toxina bacteriana e demonstra a viabilidade do método soroterápico.

Nem foi preciso mais: chegava-se à era de Vital Brazil Mineiro da Campanha

Contava há pouco ilustre personalidade americana ter visto numa biblioteca de escola médica da China volumoso tratado sobre serpentes; nada menos de três alentados volumes versavam a lenda, a filosofia, os mitos e até o significado das serpentes. A seu lado, na mesma prateleira, volume bem mais modesto continha a enumeração sistemática das espécies de ofídios daquele país. Representação de duas mentalidades: a da velha e a da nova China. Em relação à terapêutica do ofidismo também podemos dividir a história em duas eras: a de antes e a de depois de Vital Brazil.

O lampejo que iluminou a inteligência dêsse predestinado espancou as trevas da ignorância representada pelo empirismo. Urge transportar a descoberta da soroterapia antivenenosa do dominio do laboratório para o da prática diária.

Mas como, se tantas são as incógnitas? Ofídios perigosos se contam por dezenas e o sôro bom para uns é quase inativo para outros... O preparo de sôros em larga escala exige quantidades enormes de peçonha, incompatíveis com o rendimento mínimo das capturas sistemáticas. A técnica para avaliação do seu poder curativo está ainda por inventar-se...

Aqui começa a revelar-se a sua personalidade.

Tem o dom de simplificar as questões complexas, reduzindo-as a proporções que tornam exequível a solução. O labirinto não tem saída? Abre-lhe uma brecha. O nó não pode ser desatado? Corta-o. Novo Colombo, põe de pé o ovo a seu modo.

Não é possivel multiplicar os sôros e preparar um tipo para cada cobra? Separa as serpentes por grupos zoológicos e em vez de um sôro para cada espécie cria um para cada gênero. Três gêneros, três sôros apenas.

Não há veneno que chegue para as enormes necessidades? Institui um sistema engenhoso de permuta de cobras por sôros e eleva o afluxo de serpentes até trinta mil por ano, numa manifestação de colaboração e cooperativismo que, verdadeiro milagre no ambiente brasileiro, perdura atravez de todas as vicissitudes.

A técnica clássica de neutralização e aferição do valor dos sôros antitóxicos recusa-se a funcionar em presença dos venenos animais? Contorna o impasse invertendo os fatores fixo e variável do antígeno e anticorpo. Solução simples e brilhante para um problema complexo.

Batalhou rudemente, mas venceu esmagadoramente, vendo baixar progressivamente a mortalidade por ofidismo, nos vinte mil casos anuais do Brasil, de trinta para dois por cento, impondo o rigor da sua técnica em época em que os primeiros tratamentos específicos apenas começavam a aparecer.

Atendendo à convocação de uma nova era surgida no domínio das ciências biológicas, buscava as dificuldades para vencê-las, a golpes de técnica ou pela experimentação paciente e aturada. Não contente de ter legado ao Brasil a glória de ter sido o primeiro país do mundo a ver resolvido o seu problema de ofidismo, ataca frontalmente o araneísmo e o escorpionismo e os risca da lista das intoxicações contra as quais a ciência era impotente, dando, ainda aqui, primazia à sua Pátria.

Mas não foi só. A peste como a febre tifóide, a varíola como o tétano e a difteria encontraram-no sempre nas trincheiras de primeira linha.

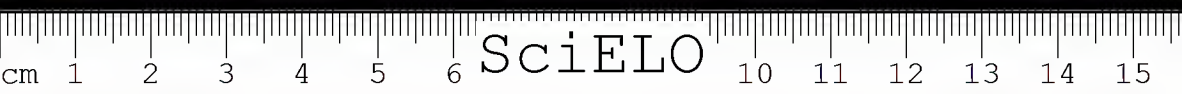
A medida da sua vitória somente poderá ser comparada à grandeza da sua fé nos métodos biológicos, de que se erigiu paladino desde os seus primordios.

E no livro de História Médica Brasileira poucas páginas se lerão com a beleza e o valor daquela em que deixou gravadas as suas conquistas. Poderá repetir com o poeta o "erigi monumentum aere perenneus", erigi monumento perene como o bronze; "non omnis moriar", não morrerei de todo...

Modesto por índole, coube-lhe, entretanto, edificar o pedestal da sua própria glória, fundamentado em instituição ímpar no mundo. Institutos mais ou menos célebres de patologia, de bacteriologia, imunoterápicos ou zoológicos os há às dezenas espalhados pelos cinco continentes: o Butantan entre todos se destaca por sua fisionomia própria e a sua fama se irradia até onde alcança a civilização. Dêsse templo da Ciência expulsou com o látego da técnica os vendilhões que abusando da credulidade inata do povo impingiam-lhe mésinhas, inócuas umas, mortíferas outras. E as vergastadas da História hão de castigar a todos os que, por incompreensão ou por incompetência, lhe prejudicarem a obra meritória.

Dos homens não esperou qualquer recompensa, nem a recebeu na proporção dos serviços que lhes prestou e quando dele se lembraram para inscrever-lhe o nome no Livro do Mérito, o que mais admirou a todos foi não lhe ter sido antes conferida distinção equivalente.

E os continuadores de sua obra no Butantan, ao procurarem sintetizar num mínimo de palavras a benemerência da obra do fundador desta Casa, não encontram vocábulos mais expressivos e mais adequados, do que os que compõem o seu próprio nome: êste mineiro venceu campanha vital para o Brasil.

F. F.

REVISÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *ENOPLOCTENUS* SIMON, 1897

POR WOLFGANG BUCHERL

(Da Divisão de Zoologia Medica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

1. INTRODUÇÃO.

No periodo dos últimos 70 anos foram descritos pelos autores Bertkau, Simon, Keyserling, Strand, Mello-Leitão, nada menos de 13 espécies distintas de *Enoploctenus*, familia *Ctenidae*. Todas estas espécies são sul-americanas e, com excepção de uma, exclusivamente brasileiras. O biotopo é ainda mais restrito, pois foram encontradas estas espécies sempre em montanhas ou nas suas encostas, tanto da Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro, da Serra do Mar, desde o Estado do Rio até Santa Catarina, como em outras serras dos Estados de Minas Gerais e Mato Grosso.

Em vista deste habitat bastante restrito, causou-nos admiração que existissem tantas espécies diferentes deste gênero e nos propuzemos a rever as mesmas, tanto pelas descrições originais e pelos desenhos dos autores, como da coleção de *Enoploctenídeos* do Instituto Butantan.

2. MATERIAL E MÉTODO.

Após termos reunido toda a bibliografia sobre o assunto, com as descrições originais dos diferentes autores, comparâmos morfologicamente todos os caracteres externos dos exemplares da coleção do Instituto Butantan, que perfazem 93 exemplares. Foram estudados os bulbos copuladores dos machos adultos; os epíginos já evoluidos das fêmeas adultas; os epiginos menos evoluidos das fêmeas jovens; os principios da formação tanto dos bulbos como dos epiginos em individuos ainda mais jovens; a posição e as dimensões dos olhos, principalmente dos 4 olhos medianos anteriores; o número e as dimensões dos denticulos em ambas as margens das queliceras; o número, a posição e as dimensões dos espinhos nos fêmures, nas tíbias e nos metatarsos das pernas e dos palpos; a extensão das escópulas na face ventral dos metatarsos; o colcrido geral e suas variações. Finalmente temos aferido em todos os exemplares as medidas, tanto o comprimento total (sempre menos exato, porque as dimensões do abdomem

Entr. para publicação em 22 de novembro de 1950.

variam conforme o estado de nutrição ou inanição ou ainda segundo as retrações, condicionadas à conservação em meio alcoólico), como o comprimento e a largura do cefalotorax; o comprimento total das 4 pernas; os comprimentos dos fêmures em relação às tíbias; o comprimento das tíbias em relação aos metatársos; o comprimento das patelas e tíbias do 1.º par de pernas em relação ao mesmo do 4.º par.

Os dados obtidos e as variações individuais foram, então, comparados com as descrições originais dos autores, conferindo-se ainda o habitat.

Assim pudemos ver claramente onde e em que ponto um autor descreveu simplesmente uma aranha jovem, atribuindo ao epígino ainda mal formado, importância especificamente decisiva; onde um outro autor, pela variação do número de espinhos, julgou ter provado que esta variação seria constante e específica. Há mesmo descrições de indivíduos, cuja posição no gênero deve ser colocada em dúvida.

Finalmente, chegámos a ver que se descrevera como nova espécie o que na realidade era apenas o macho ou a fêmea de uma outra espécie já conhecida.

Suspeitamos até da possibilidade de que, algumas vezes, em exame menos acurado, tenham sido confundidos exemplares de duas famílias diferentes.

Os indivíduos do gênero *Acanthoctenus* realmente apresentam a morfologia dos espinhos, das escópulas, etc., como os de *Enoploctenus*, apenas com ligeiras variações, principalmente na posição dos olhos médios posteriores e suas dimensões, na presença de espinhos também nas patelas das pernas, etc.; entretanto *Acanthoctenus* pertencente à família *Acanthoctenidae*, com cribelo e calamistro. Mas estes dois caracteres, principalmente em indivíduos mais jovens, são de difícil apreciação, mesmo com grande aumento. O calamistro só é visível nestes exemplares em certa posição da perna posterior e o cribelo fica muitas vezes confundido com u'a mancha esbranquiçada, em frente às fiandeiras.

3. CARACTERIZAÇÃO DE *ENOPLOCTENUS* E SUA POSIÇÃO NA FAMÍLIA *CTENIDAE*.

O gênero *Enoploctenus* pertence à família *Ctenidae* Keys., 1876. Petrunkevitch (1) caracterizou esta família da seguinte maneira:

"Sem cólulo, cribelo e calamistro; com 6 fiandeiras e 8 olhos homogêneos, diurnos, dispostos em tres fileiras (2-4-2 ou 4-2-2). Quelíceras escopuladas e munidas de dentes nas duas margens. Lábio livre. Maxilares paralelos. Pernas com espinhos. Tarsos e metatarsos escopulados. Com duas garras denteadas nos tarsos. Tufos subungueais presentes. Com numerosas tricobotrias, dispostas em 2 fileiras, tanto nos tarsos, metatarsos como nas tíbias. Fóvea torácica longitudinal. Espiráculos das traquéias próximos às fiandeiras. Sistema traqueano limitado ao abdomen."

A esta caracterização, puramente morfológica, podem ajuntar-se algumas particularidades biológicas:

"Aranhas tipicamente errantes (wandering spiders), que não constroem teias, mas vivem de caça, principalmente à noite. Matam suas vítimas pelo veneno que, em algumas espécies, é composto de substâncias tão ativas que a picada se torna perigosa para o próprio homem.

Após a cópula a fêmea constroe uma ooteca em que deposita 800 a 1.200 ovos em média. Carrega consigo a bolsa de ovos, entre as quelíceras, até que, depois de um mês e meio, nos climas tropicais, irrompam os filhotes. Estes ficam aglomerados sobre o corpo da mãe até a segunda muda de pele (a 1.ª efetua-se geralmente dentro do próprio casulo) a verificar-se, em média, e em ambiente de temperatura e umidade do ar fovoráveis, já dentro de 7 a 10 dias após a ruptura da bolsa de ovos.

Abandonada a mãe, constroem os filhotes um tecido alvo em forma de panela, onde se escondem e de onde fazem suas primeiras excursões, voltando sempre à teia. Suas primeiras vítimas são os próprios companheiros, começando o canibalismo a partir da 3.ª muda de pele e sendo particularmente ativo por ocasião das ecdises, em que os indivíduos que primeiro completaram a muda, costumam matar e devorar as companheiras imobilizadas e indefesas, à espera da ruptura da cutícula.

Desta ecdise em diante realiza-se a dispersão e a vida errante, não sendo mais construida uma teia especial. No primeiro ano de vida pode haver 5-7 mudas de pele e a fome dos pequenos e ageis aracnídeos é praticamente insaciável; no segundo ano verificam-se 3 a 4 ecdises, não se podendo, até esta idade, distinguir morfologicamente os machos das fêmeas. Somente no 2.º ou 3.º ano de vida, através de uma ou duas ecdises anuais, diferenciam-se os dois sexos, sendo então as fêmeas caracterizadas por uma complicada estrutura quitinosa, o epigino, localizado na base do ventre — e os machos pelo aparecimento, nos tarsos dos palpos, do bulbo copulador, cuja estrutura morfológica corresponde sempre à do epigino da fêmea da mesma espécie.

Os ctenídeos adultos podem viver 5 anos pelo menos, principalmente nos climas tropicais e subtropicais, trocando as fêmeas de pele uma vez por ano (excepcionalmente 2 vezes), enquanto que os machos adultos nunca mais absolvem processos ecdisários.

Uma vez por ano procuram-se os 2 sexos para a realização da cópula, armazenando, então, as fêmeas o liquido fecundante que contêm os pacotes de espermatozóides em seus receptáculos seminais. Elas mesmas fecundam os óvulos na ocasião da postura e, mais ou menos, um mês e meio a dois meses após a primeira postura, tecem nova ooteca, menor que a primeira e procedem à segunda oviposição e fecundação. Após a dispersão deste segundo lote de filhotes, provenientes de 300 a 400 ovos, em média, e ainda segundo o estado

físico da mãe, verifica-se freqüentemente, principalmente nos gêneros *Ctenus* e *Phoneutria*, uma terceira fabricação de casulo com oviposição. Desta vez, porém, os ovos costumam ser pouco numerosos (de 40 a 100), menores que os das posturas precedentes, sendo mesmo muito mal formados e não fecundados, nascendo apenas poucos filhotes e não prosseguindo, muitas vezes, a mãe em seus desvelos, perecendo, em consequência, os embriões já nos primeiros dias de seu desenvolvimento. Através de muitas observações, por longos anos, firmou-se em nós a impressão de que as fêmeas adultas, no período imediato à muda de pele, acumulam enormes reservas. Seu abdomen entumece pelo crescimento descomunal dos ovários; suas glândulas sericígenas proliferam e seus reservatórios seminais ficam repletos de espermatozóides (na cópula anual). Procuram elas, então, esgotar estas reservas, primeiro pela grande quantidade de fios de seda, gastos na construção dos diversos casulos; segundo, pelas oviposições seguidas e, terceiro, pela fecundação dos ovos. Esta tendência de esgotar-se vai a tal ponto que se podem observar fêmeas que iniciam um terceiro casulo, mas não o podem terminar ou procedem à oviposição e interrompem a mesma ou expelem ovulos, não fecundados, pequenos, angulosos e inaptos à sobrevivência. Elas mesmas, pelos meses de fome, pois não se alimentam geralmente enquanto cuidam dos casulos, ficam tão enfraquecidas que procuraram permanecer o mais possível no mesmo local sômbrio, imóveis, até a dispersão definitiva dos poucos filhotes da terceira postura. Logo depois perfazem sua muda e então se lançam avidamente à caça afim de abastecerem-se de novas energias para um novo ciclo anual.

Os gêneros *Ctenus* e *Phoneutria* incluem espécies brasileiras de porte assáz avantajado, caçadoras intrépidas, de hábitos noturnos, bastante agressivas, sempre prontas a se defenderem, armando tremendos botes contra um eventual inimigo. Não se intimidam, nem mesmo perante o homem. Devido à ação veemente de sua peçonha, seus costumes de caçar à noite e perseguir os insetos mesmo pelas residências humanas a dentro e devido ainda à grande rapidez de seus movimentos, principalmente dos machos — mais agéis e com pernas mais longas e que as fêmeas — si bem que as últimas sejam geralmente maiores e mais agressivas, constituem algumas espécies destes gêneros uma s é r i a p r e o c u p a ç ã o m é d i c o - s a n i t á r i a. Para neutralizar sua peçonha é necessário, em muitos casos, recorrer-se ao sôro "anti-ctenico", produzido pelo Instituto Butantan."

A família *Ctenidae* é hoje subdividida em 3 subfamílias, para os quais Petrunkevitch (*loc. cit.*) elaborou a seguinte chave:

1. Lábio mais largo que longo, sem reentrâncias laterais e não atingindo o meio das lâminas maxilares — *CALOCTENINAE*.
   Lábio mais longo que largo, com reentrâncias laterais e atingindo aproximadamente o meio das lâminas maxilares 2

2. Pernas com espinhos robustos e moderadamente longos, geralmente em numero de 3 a 5 (raras vezes 6) pares ventrais nas tibias anteriores. Olhos 2-4-2. Cefalotorax mais alto na região da fóvea torácica — *CTENINAE.*

Pernas com espinhos muito longos, mais flexíveis e geralmente mais de 6 pares ventrais nas tíbias anteriores. Olhos 2-4-2 ou 4-2-2 (no último caso os da 1.ª fileira bem menores que os da 2.ª) Cefalotorax elevando-se sempre mais em direção à fronte — *ACANTHEINAE.*

Melo-Leitão estabeleceu ainda uma quarta subfamilia — *Argoctenínae.* O gênero *Enoploctenus,* pertencente à subfamilia *Acantheinae,* foi caracterizado por E. Simon (2) da seguinte maneira:

"Parte frontal do cefalotorax mais alta que a parte torácica. Os 4 olhos do meio são grandes, sub-iguais, formando uma área subquadrada, um pouco mais larga na frente que atrás e raras vezes um tanto mais longa que larga. O. L. A. pequenos, em plano mais baixo, formando com os médios, posteriores, uma linha muito procurva e quase equidistantes tanto dos medios anteriores como dos medios da 2.ª fila. Clipeo mais largo do que a área dos olhos medianos.

Margem inferior das quelíceras com 4 dentes; o último mais afastado dos outros. Lábio mais longo que largo. Pernas longas, com os tarsos escópulados. As 4 tibias anteriores com 7 pares de acúleos inferiores, muito longos e eretos; metatarsos com 3+3 e mais alguns acúleos laterais. Os 4 metatarsos anteriores mais curtos que as tibias; os posteriores mais longos."

E. Strand (3) viu-se forçado a incorporar *Phymatoctenus* Simon, 1897, neste gênero, prevalecendo o nome definitivo de *Enoploctenus* por prioridade de página. Verifica-se realmente uma transição das espécies dos 2 gêneros ou melhor, a caracterização genérica, fornecida por Simon e que insiste principalmente na área formada pelos 4 olhos medianos e a distância que medeia entre os olhos laterais anteriores dos médios e laterais da 2.ª fila, é por demais sujeita a variações individuais para que se possa, com fundamento, estabelecer 2 gêneros. O mesmo se diga no tocante ao número de espinhos na face ventral das tibias. Estamos, pois, neste particular, inteiramente de acôrdo com Strand e achamos mesmo que, toda vez que se põe em foco uma posição genérica dúbia, mais proveito trazem para a sistemática trabalhos objetivos sobre o âmbito das variações especificas de espécies já conhecidas e bem definidas do que descrições isoladas de novas espécies ou novos gêneros.

Quanto aos hábitos biológicos das espécies de *Enoploctenus* deve ser dito que são aracnideos que preferem como habitat as alturas (Serra dos Orgãos; Corcovado; Terezopolis; Ilha de São Sebastião; Serra do Mar). São de porte relativamente grande; bastante velozes; bem menos agressivos do que as espécies do gênero *Phoneutria;* muitas vezes com colorido vistoso. De hábitos noturnos, costumam esconder-se durante o dia em ocos de arvores, sob

raizes, sob cascas parcialmente desprendidas, em bromeliáceas, etc.. Quando surpreendidos, desatam a fugir veloznente. Não costumam enfrentar o inimigo e colocar-se em atitude agressiva, como as espécies do gênero *Phoneutria.* Não se conhecem acidentes humanos, determinados por mordedura das espécies de *Enoploctenus;* tão pouco é conhecido seu veneno, cuja ação deve ser provavelmente bem menos ativa do que a de *Phoneutria.*

4. AS ESPÉCIES DE *ENOPLOCTENUS* SIMON, 1897

Até agora foram descritas sómente espécies sul-americanas, principalmente do sul do Brasil, ao longo da Serra do Mar, a começar do Rio de Janeiro até Santa Catarina.

Nem sempre as espécies descritas eram representantes tipicas do gênero e muitas vezes mesmo só foram descritas formas juvenis ou no início da madureza sexual. Na grande maioria dos casos era sempre descrito um sexo somente, desconhecendo os AA. o outro sexo, pois tratava-se de exemplares, geralmente colhidos no Brasil por viajantes estrangeiros e depositados em coleções estrangeiras, às vezes em estado de conservação bastante precário.

As espécies são as seguintes:

1. *Enoploctenus germaini* Simon, 1896 (4).

> "Os 4 olhos do meio muito grandes, quase iguais, formando um quadrilátero um pouco mais largo na frente; olhos laterais anteriores quase equidistantes dos laterais e médios da 2.ª fila. Margem inferior das quelíceras com 4 dentes, o quarto mais isolado. Face ventral das 4 tíbias anteriores com 7 pares de espinhos; metatarsos dos primeiros 3 pares de pernas com espinhos muito longos.
>
> Cefalotorax vermelho fusco, mais claro na frente; região dos olhos enegrecida; pêlos longos de um amarelo pálido, com manchas doiradas na região ocular. Abdomen oblongo, amarelo, com tons cinzentos e com pontuações fusco testáceas. Com uma linha longitudinal lanceolada e um tanto avermelhada. Na margem anterior do abdomen duas linhas curtas convergentes. Perto do meio pequenas pontuações negras.
>
> Esterno e boca vermelhos; quelíceras negro cinza. Pernas oliváceas; as últimas com largos aneis amarelo avermelhados." .

Habitat: — Rio de Janeiro.

Material estudado pelo autor: — 1 fêmea jovem, com 21,2 mm de comprimento total.

Mello-Leitão (5) constatou a presença desta espécie desde o Rio de Janeiro até o Paraná (Cachoeirinha), sem ter procedido, entretanto, a uma redescrição em material melhor conservado.

2. *Enoploctenus scopulifer* Strand, 1908 (6)

"Com o mesmo colorido, mais ou menos, como *germaini*, do qual se distingue pela parte frontal do cefalotorax mais elevada, pelo abdomen mais baixo e truncado (não oblongo). Lábio apenas um pouco mais longo que largo. Metatarsos I e II com escópulas na área dos tres quartos apicais."

Habitat: — Joinville, Santa Catarina.

Material estudado pelo autor: — 1 fêmea jovem, com as seguintes medidas: — comprimento total: — 21,5 mm; cefalotorax — 10 por 8 mm; pernas: 39,5 — 36.7 — 32.5 — 40.3 mm respectivamente; patela e tibia I-15 mm; pat. e tíbia IV-13,5 mm.

3. *Enoploctenus pedatissimus* Strand, 1910 (7)

"Todos os fêmures com 3 espinhos superiores, 4 anteriores e 4 posteriores. Patelas do III e IV par com 2 espinhos anteriores e 2 posteriores; patelas I e II parecem ter apenas 1 espinho anterior. Tibias I com 6 pares de espinhos inferiores; 2 anteriores e 3 superiores. Tibias II como I. Tibias III e IV com 3 pares de espinhos inferiores, 2 espinhos posteriores e 2 superiores.

Metatarsos I e II com 3 pares de espinhos inferiores e com 2 muito pequenos perto da ponta e mais 3 anteriores e 3 posteriores. No IV par os espinhos são numerosos e de disposição irregular.

Palpos: — fêmures — 5 espinhos superiores; patelas — 1 interior; tibias — 2 basais internos e 1 superior.

Margem inferior das quelíceras com 4 dentes iguais, muito juntos; margem superior com 3, o interno bem menor.

Lábio tão longo quanto largo ou apenas um pouco mais longo, não atingindo quase o meio das lâminas maxilares. Todos os tarsos escopulados, no IV com cerdas no meio. Metatarsos 1-3 com pequenas escópulas apicais. Fiandeiras superiores tão longas quanto as inferiores. Área mediana dos olhos tão longa quanto larga, atrás um nada mais larga que na frente. O. M. P. um pouco maiores que os M. A. Médios anteriores afastados entre si por menos de seu diâmetro, dos médios posteriores pelo seu diâmetro, dos médios posteriores pelo seu diâmetro, da margem do clípeo por mais de seu diâmetro. Segunda fila dos olhos tão procurva que uma tangente à borda inferior dos médios posteriores e à borda superior dos laterais posteriores forma uma reta. Laterais anteriores separados dos laterais posteriores e dos médios posteriores pelo seu diâmetro mais longo e dos médios anteriores por mais. Laterais anteriores maiores que em *Phymatoctenus comosus* Sim. ou *Enoploctenus germaini* Sim.

Cefalotorax marrom cinza com faixa mediana longitudinal amarelo clara, bem nítida, tão larga na frente como a área dos olhos medianos, terminando atrás em ponta. Faixa marginal torácica amarelada com pêlos brancos sobre fundo amarelado.

Região ocular e clipeo enegrecidos; mandibulas marrom avermelhado claro, na frente, com pontas enegrecidas, na metade basal com 2-3 estrias escuras.

Lado inferior cinza amarelado. Pernas oliváceas, marrom amareladas, com 2 aneis enegrecidos nos fêmures.

Abdomen cinza marrom, com pêlos vermelhos; em cima na metade basal com estria longitudinal estreita, branca, margeada de vermelho e, em cada lado, 3 manchas negras. Mais atrás 2 pares das mesmas manchas, mas menores e mais 2 a 3 pares de feixes de pêlos longos, eretos, brancos.

Ventre cinza marrom, com 4 fileiras de manchinhas brancas, muito pequenas, seriadas, convergentes atrás. Mais 1 ou 2 destas fileiras em cada lado."

Habitat: — Santa Inaz. (nome certo?), Ecuador.

Material estudado pelo autor: — 1 macho, com as seguintes medidas: comprimento total-15 mm; cefalotorax-7: 5, 5mm; pernas-45-40.5, 37-44; patela e tibia I-15.5 mm; pat. e tib. IV-13 mm; metat. I-13 mm; Iv-15 mm.

O próprio autor não considera esta aranha um *Enoploctenus* muito típico, mas diz não ser possível, pela caracterização genérica, dada por Simon, separar as espécies dos gêneros *Enoploctenus* e *Phymatoctenus*.

4. *Enoploctenus* sp. (*janeiroensis* n. sp.?) Strand, 1910 (7)

"Todos os fêmures com 3 espinhos superiores. I com 3 anteriores e 3 posteriores, os anteriores mais longos e menos regulares; II e III com 4 espinhos anteriores e 4 posteriores. Patelas I — III sem espinhos (sempre?); III e às vezes I com um pequeno espinho posterior. Tíbia I com 8+7 espinhos inferiores, deitados e tão longos que os proximais ultrapassam a base do par seguinte pela metade de seu comprimento: na face anterior 1 basal e 1 apical (parece que ambos podem estar ausentes); 2 espinhos posteriores basais. Tíbia II 7 pares inferiores, 2 anteriores e 2 posteriores. Tíbia III com 3 pares inferiores, 1 anterior, 1 posterior ou 2 em cada logar e 1 superior. Metatarso I-3 pares inferiores, 1 ou 2 anteriores e 1 posterior semi-basal; II como I, porém 1 anterior somente; III com 3 pares bem robustos no lado inferior e 2 pequenos apicais, com 3-4 anteriores e 3 posteriores.

Palpos: — fêmur com 5 superiores; patelas com 1 interno; tíbias, internamente, 2 semi-basais, 2-3 superiores, 1 exterior.

O tarso, em que o órgão copulador ainda não está completamente desenvolvido apresenta 3 espinhos no lado interno, 1 externo e uma garra fortemente denteada.

Cinza-marrom, com manchas mais escuras nos fêmures e nas tíbias. Abdomen ausente.

Area dos 4 olhos medianos da mesma largura na frente e atrás, mais longa que larga. Distâncias dos olhos medianos como em *E. pedatissimus*."

Habitat: — Corcovado, cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Material estudado pelo autor: — 1 macho jovem e bastante danificado (sem abdomen), mas descrito detalhadamente por se tratar de uma espécie dum gênero pouco conhecido e para o qual, caso seja confirmado que se trate de uma espécie nova, o autor propõe o nome de *E. janeiroensis*.

Comprimento total-10 mm; cefalotorax-8:5 mm; pernas-44 — 44,5 — 41,5 — 36,8 — 5-41. 5-36. 8-(o quarto falta); patela e tibia I-17.

5. *Enoploctenus geralensis* Strand. 1910 (7)

"Epígino 2 mm de comprimento por 1,7 mm de largura. Em estado sêco se apresenta com uma parte mediana, pentagonal, mais alta e com uma fenda longitudinal anterior.

Em frente existe em cada lado uma cavidade redonda, profunda, a delimitar a peça mediana. Ao lado da cavidade há em cada lado uma apófise curta, vertical, continuada por duas fossas, negras, brilhantes e continuadas por uma saliência negra.

Em estado úmido pode-se observar bem a faixa preta, brilhante que circunscreve a peça mediana, também em sua porção anterior. Peça mediana avermelhada; cavidades esbranquiçadas.

Tíbias I e II com 7 pares de espinhos inferiores, longos; 2 posteriores sub-basais; 1 anterior sub-basal; 2 ou 1 superiores pequenos. Todos os fêmures, como em todas as outras espécies do gênero, com 3 fileiras de espinhos; as patelas parecem não ter espinhos. Metatarsos I e II com 6 espinhos inferiores em 3 pares, muito robustos e 1 pequeno anterior e posterior perto da base. Tibias e metatarsos III e IV como em *janeiroensis*.

Vermelho marrom claro; fêmures e tibias com aneis mais claros. Abdomen tão estragado que não mais se podem distinguir ornamentos coloridos.

Área dos 4 olhos medianos um pouco mais longa que a largura posterior; lado anterior um pouco mais estreito. Olhos medianos anteriores menores que os posteriores, afastados entre si quase o seu diâmetro, dos posteriores um pouco mais do seu diametro e da margem do clipeo por um diametro e meio. Uma linha tangente à borda posterior dos laterais anteriores formaria uma reta."

Habitat: — Serra Geral, Brasil.

Material estudado pelo autor: — 1 fêmea adulta, com as seguintes dimensões: — comprimento total-24 mm; cefalotorax-9.5: 8 mm; pernas-45-41,5 — 38,5 — 45-41.5-38,5-45 mm; patelas e tibias I-17,5 mm.

Da mesma procedência o autor refere 3 fêmeas jovens e um macho jovem.

6. *Enoploctenus maculipes* Strand. 1910 (7)

"Em todos os fêmures 3-5 espinhos pequenos, superiores; I na face anterior 2 espinhos pequenos superiores, distantes entre si e 2 espinhos inferiores, longos e robustos e muito juntos; na face posterior 4 espinhos pequenos. II e III nas faces anterior e posterior 4 espinhos; IV com 4 espinhos anteriores e 3 posteriores; patelas parecem estar desprovidas de espinhos. Tibias com 6 pares de espinhos inferiores longos e 3 espinhos posteriores, curtos. II como I, mas com apenas 2 posteriores e mais 1 para pequeno apical, inferior. III com 3 pares de espinhos inferiores, 2 na face anterior e posterior e 1 superior sub-apical. IV como III. Metatarsos I e II com 3 pares inferiores, robustos e 2 muito pequenos apicais e mais 3 nas faces anterior e posterior.

Epígino quase como em *geralensis*.

Cefalotorax morrom, com faixa dorsal amarela, levemente lanceolada em torno da fóvea torácica preta. Fêmures com manchas dorsais mais escuras; tíbias com 2 aneis largos e escuros; os mesmos aneis nos metatarsos.

Abdomen cinza escuro, com faixa longitudinal esbranquiçada e com pontuações pequenas, marrons, irregulares. Mais atrás provavelmente com manchinhas esbranquiçadas, formadas por feixes de pêlos e eretos.

Ventre marrom."

Habitat: — Minas Gerais.

Material estudado pelo autor: — fêmea, com as seguintes dimensões: — *Cefalotorax* — 7,5: 6 mm; pernas-36-34-30,5-38,8 mm; patela e tíbia I-13,5 mm; IV — 11,8 mm.

7. *Enoploctenus zonatulus* Strand, 1910 (8).

"A forma e o número de espinhos nas pernas concordam quase completamente com os de *maculipes*, principalmente nos fêmures e nas patelas.

Cefalotorax e pernas marrom amarelado, com uma tonalidade para o vermelho; fêmures com manchas mais escuras e pouco distintas; tíbias em cima com u'a mancha mediana larga e uma menor, basal, com pêlos brancos; metatarsos com duas manchas semelhantes, sendo a basal a maior.

Abbdomen marrom escuro, um tanto avermelhado, na segunda metade com uma faixa longitudinal amarelada e na metade anterior com estria clara. No meio duas manchas bem escuras. Nos lados da segunda metade, e em cima pequenas manchas brancas, formadas de feixes de pêlos longos, eretos.

Ventre cinza claro, com tonalidade marrom. De campo mediano mais escuro, que se estreita atrás e que inclui duas linhas, divergentes em frente e que, nos lados, está delimitado por duas outras linhas, paralelas às internas, mal atingindo a região das fiandeiras. Pêlos brancos, em parte dispostos em fileiras, no ventre.

Margem inferior das quelíceras com 4 dentes iguais; o interno um tanto isolado. Margem superior com 3 dentes, o mediano maior.

Área dos 4 olhos medianos um pouco mais longa que larga, da mesma largura na frente e atrás. Distância inter-oculares como em *janeiroensis*. Segunda fileira ocular procorva (linha tangente na borda anterior dos laterais posteriores e na borda posterior dos médios posteriores procurva)."

Habitat: — Terezópolis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Material estudado pelo autor: — 1 fêmea jovem, com as seguintes medidas: — comprimento total-22 mm; cefalotorax-10:8 mm; pernas-39-35,5-30,7-38 mm; patelas e tíbias I-15; IV-12 mm.

Mello-Leitão, em 1936, descreveu um macho, de Rio de Janeiro, com as seguintes dimensões: 20 mm; 60,2-55,5-46-55,5;

8. *Enoploctenus morbidus* Mello-Leitão, 1939 (9)

"Segunda fila ocular procurva. Área dos olhos médios mais longa que larga; os olhos anteriores menores que os posteriores, mais estreita adiante. Clipeo com um denso tufo mediano de cerdas dirigidas para a frente, da largura de um diâmetro dos olhos anteriores.

Margem inferior das quelíceras com 3 dentes, o proximal menor e mais isolado.

Pernas I: — tíbias com 6 pares de espinhos inferiores, 3 anteriores, perto da face dorsal, 4 anteriores mais ventrais e 4 posteriores; metatarsos com 6 pares de espinhos inferiores, sendo os apicilares muito pequenos, 3 anteriores e 3 posteriores.

Pernas II: — tíbias com 6 pares inferiores, na face anterior 5 superiores e 2 inferiores e mais 3 na face posterior. Metatarsos 4 pares inferiores (os apicilares muito pequenos), 1 dorsal e 1 lateral basilar.

Cefalotorax e pernas pardos, irregularmente manchados de pêlos trigueiros, com uma faixa mediana mais clara no cefalotorax. Quelíceras fulvo-escuras. Ventre cinzento palido uniforme. Dorso do abdomen cinza escuro, com 3 pares de manchas amarelo-pálidas.

Habitat: — Salôbra, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Material estudado pelo autor: — 1 macho, com as seguintes dimensões: Pernas:-37,4-28, 8-26, 2-36,4 mm; patela e tibia 1-14,2 mm; IV-11,4 mm.

O mesmo Autor, alguns anos antes, já tinha descrito mais as tres espécies seguintes:

9. *Enoploctenus fallax* Mello-Leitão, 1922 (10)

Fêmea: 17 mm; pernas: 37-34-31-40 mm.

Cefalotorax baixo, com um profundo sulco torácico; região cefálica bem mais elevada, em aclive, separada da torácica por profundos sulcos, convergentes, atrás. Clipeo mais longo que a área dos olhos médios, que é paralela e de olhos iguais.

Segunda fila ocular fortemente procurva (uma reta tangente à borda anterior dos médios passa bem atrás da borda posterior dos laterais). Margem inferior das quelíceras com 4 dentes, sendo o último mais distante e com 3 na borda superior, dois iguais e o terceiro menor. Lábio pouco mais longo que largo, chanfrado, de borda anterior côncava. Tíbias dos 2 primeiros pares de pernas com 7 pares de espinhos inferiores (os apicais menores), mais 1 anterior e 2 posteriores; metatarsos com 3 pares ventrais muito longos e 1 basal de cado lado.

Cefalotorax fulvo escuro; pernas pardo escuras, aneladas de fulvo; abdomem igualmente fulvo escuro, manchado de negro. Epigino nigerrimo, cerca de duas vezes mais largo que longo, com dois tubérculos posteriores.

Habitat: — Marianna, Estado de Minas Gerais

Material estudado pelo autor: — 1 fêmea.

10. *Enoploctenus Rondoni* Mello-Leitão, 1922 (11)

Segunda fila dos olhos fortemente procurva (uma reta tangente da borda anterior dos médios passa muito atrás da borda posterior dos laterais). Área dos olhos medianos quadrada; os 4 olhos iguais. Quelíceras com 4 dentes na margem inferior e com 3 na superior, sendo o mediano o maior. Lábio mais longo que largo, chanfrado na base. Tíbias dos 2 primeiros pares de pernas com 7 pares de espinhos inferiores, 1-1 anteriores e 1-1 posteriores e mais 2 inferiores, laterais; metatarsos com 3 pares inferiores e 1 anterior.

Cefalotorax côr de mogno escuro; pernas com manchas irregulares de pêlos. Abdomen pardo, manchado, com abundantes cerdas espiniformes; ventre pardo com 4 linhas longitudinais de pequenos pontos fulvo-escuros, quase paralelas.

Epígino em forma de ferradura, de concavidade posterior; com uma apófise direita, dirigida para diante e nascida no ponto anterior da mesma. Os dois ramos laterais do epígino retorcidos para diante.

Habitat: — Mato Grosso. Brasil-sem determinação do local da captura

Material estudado pelo autor: — Uma fêmea, depositada no Museu Nacional.

Medidas: — comprimento total: 29 mm; pernas: 43-41-36-44 mm. Outras medidas não são fornecidas pelo autor.

11. *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880) (12)

A especie *Ctenus cyclothorax* Bertkau, 1880-Verzeichn. Bras. Arachn., pag. 56, é considerada por Mello-Leitão como pertencendo indubitavelmente ao gênero *Enoploctenus*, pois, como afirma o próprio Bertkau e mais tarde Keyserling (Spinnen Amerikas, Bras-Sp. pag. 143, 1891), apresenta esta espécie o cefalotorax nitidamente dividido em parte frontal e parte torácica, facilmente distinguiveis pelas reentrâncias das raias que partem da fóvea; os primeiros dois pares de pernas apresentam 7 pares de longos espinhos ventrais nas tíbias e a área dos olhos medianos é tão longa quanto larga.

Realmente não pode persistir dúvida sobre o acêrto de C. Mello-Leitão, em considerar esta espécie como sendo o *Enoploctenus cyclothorax*, porque os 7 pares de espinhos ventrais nas duas tíbias anteriores constituem um caracter genérico realmente valioso, como também a separação das porções frontal e torácica do cefalotorax. O quadrado, formado pelos 4 olhos medianos, a nosso ver, não constitui caráter genérico bom, como teremos oportunidade de demonstrar mais adiante.

Enoploctenus cyclothorax vem a formar a espécie mais antiga do gênero.

Habitat: — Rio de Janeiro. Brasil.

12. *Enoploctenus Wolfi* Strand, 1915 (13)

Fêmea: — 8: 6,5 mm; pernas: 31-30-26-31 mm: Pat. + tib.:-12-11,5-8,5-10 mm; metatarsos + tarsos: 10,5-10-10-12,5.

Tíbias das pernas I e II com 6 a 7 pares de espinhos ventrais e 1 basal posterior. Epigino do tipo comum às fêmeas do gênero, isto é, com uma peça mediana em forma de ferradura e com um par de peças laterais, em cuja porção anterior há um dente saliente.

Cefalotorax marrom claro; abdomen oliváceo escuro, com manchinhas enegrecidas, um tanto indistintas, com uma faixa dorsal mediana, lanceolada, mas clara e semelhante à de *E. scopulifer*. Faixa lanceolada margeada de orla preta, nos lados e na frente por estrias pretas sinuosas. Abdomen no dorso e nos lados com feixes de pêlos branco róseos. Ventre com um campo preto, convergente atrás, incluindo duas fileiras de manchinhas muito pequenas, marrons.

Pernas com manchas enegrecidas e com feixes de pêlos branco róseos.

Habitat: — Joinville, Santa Catarina.

Do mesmo local foi descrito pelo mesmo autor tambem um macho, cujo colorido se aproxima bem de *E. scopulifer*, com exceção das côres do ventre, que são iguais como na fêmea. As medidas são bastante incompletas, porque falta a quarta perna. Comprimento do cefalot. 9: 7,8 mm; Pernas 56-52-46,5.

Tíbias 1 e 2 com 6 pares de espinhos inferiores e com 1+1+1 superiores e 1+1 posteriores basais.

O autor finaliza suas considerações, com as seguintes palavras: — "Die Zusammengehörigkeit der beiden Geschlechter dürfte trotz Abweichungen in Dimmensionen und Zeichnung doch sicher sein."

13. *Enoploctenus Strandi* Mello-Leitão, 1936 (14)

Região cefálica ligeiramente elevada. Segunda linha ocular procurva; olhos distantes entre si menos de um diâmetro e dos laterais mais de um. Olhos laterais 4 vezes menores do que os médios. Estes iguais, formando um quadrilatero perfeito. Faixa frontal tão larga como a distância dos olhos medianos anteriores.

Margem inferior das quelíceras com 4 dentes, superior com 3. Lábio um pouco mais longo que largo, atingindo o meio das lâminas maxilares.

Tíbias dos primeiros dois pares de pernas com 7 pares de espinhos inferiores e 1+1 em cada lado; metatarsos das mesmas pernas com 3 pares inferiores, mais 1 lateral basal e com escópulas até a base.

Cefalotorax alaranjado, com uma larga faixa mediana mais clara, coberta de pêlos cinzentos. Região ocular quase preta. Dorso do abdomen marrom, ornado de uma larga faixa mediana longitudinal pálida, onde há uma estreita linha vermelha sobre a metade anterior. Ventre pálido.

Habitat: — Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

Material estudado pelo autor: — Um macho com as seguintes dimenses: Pernas: 35-32,5-28,6-35,5 mm; pat. + tib. 13,5-12-9,8-11; metat. 9-8,5-8-11.5 mm. Outras medidas não são fornecidas.

5. APRECIAÇÕES CRÍTICAS DAS ESPÉCIES.

Temos comparado cuidadosamente as descrições das 13 espécies, juntamente com as ilustrações originais. Procedemos igualmente a um estudo morfológico detalhado e comparativo das espécies de *Enoploctenus* da coleção do Instituto Butantan.

No decurso destes estudos chegamos à conclusão de que o número atual das espécies de *Enoploctenus* deve ser reduzido consideravelmente.

Para que os interessados possam inferir, com maior precisão, do asserto desta simplificação sistemática, vamos, a seguir, redescrever a caracterização genérica de *Enoploctenus*. Depois consideraremos as espécies válidas e discutiremos o valor das descrições das outras.

a) *Caracterização do gênero*:

O gênero *Enoploctenus* é constituido por aranhas verdadeiras (*Araneomorphae*), cujas queliceras se articulam em sentido horizontal; não apresentam cribelo nem cóculo e calamistro. Têm 6 fiandeiras; 8 olhos em 3 fileiras (2-4-2); queliceras denteadas nas duas margens; 2 garras nos tarsos; pernas com espinhos e escópulas nos 2 tarsos; com tufos subungueais (*Ctenidae*).

Lábio livre, mais longo que largo, lateralmente escavado, extendendo-se aproximadamente até o meio das lâminas maxilares. Pernas com espinhos muito longos, um tanto flexíveis e mais de 6 pares ventro-laterais nas tíbias dos primeiros dois pares e 3 pares de espinhos ventro-laterais nos metatarsos também dos primeiros dois pares de pernas. Cafalotorax elevando-se sempre mais em direção à fronte (vide fig. 2) (Subfam. *Acantheinae*).

Os caracteres genéricos principais e invariáveis de *Enoploctenus* são, em ordem de importância, os seguintes:

Sete pares de espinhos seriados, ventrais nas tíbias dos dois primeiros pares de pernas (fig. 9).

> "Trata-se de espinhos seriados que formam 2 fileiras ventro laterais. Cada par converge, estendendo-se quase até a metade inferior do par seguinte. O sexto par distal é mais curto, mal atingindo a metade do comprimento dos precedentes. Estende-se justamente até a base do último par. O setimo par é curto, implantado no anel apical do artículo, fóra da fila dos outros e não vai além da articulação. Este ultimo par pode, raras vezes, faltar ou então falta um só, mas sempre no 1.º par de pernas.

Tres pares de longos espinhos seriados na face ventral dos metatarsos dos dois primeiros pares de pernas (fig. 9).

Estes espinhos são ainda mais longos e robustos do que os das tibias. Curvam-se um tanto para dentro, principalmente o par distal, mais curto, a terminar um pouco antes do fim do articulo. Estes espinhos seriados, quando deitados, atingem o centro do par seguinte e repousam no tapete das escópulas. Quando eretos, vêem-se seus "leitos", formados por áreas "nuas", isto é, isentas dos pelinhos das escópulas.

Parte frontal do cefalotorax mais elevada que a porção torácica (fig. 2).

Examinando-se acuradamente os perfis torácicos dos gêneros *Enoploctenus* (fig. 5), *Phoneutria* (fig. 6) e *Ctenus* (fig. 7), impõem-se as seguintes diferenças morfológicas:

No gênero *Enoploctenus* estão bem nítidos os sulcos que separam a parte torácica (em volta da fóvea) da frontal. A porção frontal decorre mais ou menos em sentido horizontal, mas eleva-se sempre numa espécie de topo na região ocular.

No gênero *Phoneutria*, ao contrário, a linha do perfil torácico percorre ou horizontalmente em toda a sua extensão ou a parte toracica, em volta da fóvea, é mais elevada que a porção ocular.

Na maioria das espécies de *Ctenus*, finalmente, a linha superior do perfil torácico acusa maior elevação na parte torácica e franco declinco na parte frontal, ocular.

Somente estes 3 caracteres morfológicos foram considerados realmente genericos para *Enoploctenus*, invariáveis, constantes, a permitir a fácil e rápida indentificação genérica de aranhas da familia *Ctenidae*, isto é, em que não existam cribelo nem calamistro.

Merecem, entretanto, ser citados ainda outros caracteres, mais ou menos constantes, genéricos também e que queremos chamar de "secundários", porque terão seu valor apenas quando, pelo confronto dos caracteres acima, já ficou demonstrado que o exemplar é realmente um *Enoploctenus*. O estudo minucioso destes caracteres secundários ajuda a aquilatar devidamente o valor dos caracteres "especificos", porque veremos, como os autores, tendo tido à mão apenas um exemplar, ora um macho, ora uma fêmea, assinalaram como sendo privativo da espécie o que na realidade não passa de um caráter do gênero, ainda que apenas secundário.

a) *Olhos* (figs. 1, 2, 3, 8):

Os 8 olhos de *Enoploctenus* formam 3 linhas:

2 olhos médios na frente;

4 olhos na 2.ª fila, sendo os 2 medianos bem grandes e os 2 laterais muito pequenos;

2 olhos grandes na 3.ª fila, bem afastaddos entre si.

A segunda fila é na realidade formada de uma linha "abstrata", porque, como os olhos desta estejam colocados em 2 planos bem diferentes-os medianos bem acima da fronte e dirigidos para a frente, com raio visual super-anterior e os 2 laterais muito abaixo, com visão infero-anterior, varia naturalmente o aspecto desta 2.ª fila conforme o ângulo de observação. A fig. 1 apresenta esta fileira vista de frente; a fig. 2 representa um aspecto lateral; a vista de cima é representada pela fig. 3, enquanto que o desenho N.º 8 procura esquematizar a posição dos olhos.

Os 2 olhos grandes da 3.ª fileira se encontram novamente em plano diferente.

Não se pode, pois, a rigor, usar as expressões "2.ª linha ocular procurva, pouco procurva, muito procurva", pois, conforme o modo de segurar a aranha, por baixo da lupa, varia a curvatura da fila. Mesmo os termos "Uma tangente à borda inferior dos medios da 2.ª fila e a borda superior dos laterais posteriores forma uma linha reta" (*E. pedatissimus*) ou "Linha tangente à borda anterior dos laterais posteriores e à borda posterior dos medios posteriores é procurva (*E. geralensis*) "— si bem que mais precisos-tambem não satisfazem plenamente, como é óbvio.

Caracteristico para o gênero é o quadrilatero, formado pelos 4 olhos, os 2 da la-fila e os 2 medios da 2.ª fila. Este quadrilatero é muitas vezes quase perfeito, isto é, os 4 olhos são quase iguais e equidistantes. Vimos variações, até individuais, podendo os M. A. ser um pouco menores que os M. P., ou o quadrilatero ser um pouco mais longo que largo ou vice-versa ou mesmo um nada mais largo atrás que na frente. Mesmo a posição destes olhos pode sofrer individualmente ligeiras variações-o que por muitos autores foi considerado como motivo suficiente a uma nova espécie. Ao todo, entretanto, sempre se tem a impressão de um quadrilatero ocular.

b) *Margens das quelíceras* (fig. 4):

Margem inferior com 4 dentes; os 3 externos bastante unidos e o 4.º, basal, mais isolado e maior. Margem superior apenas com 3 dentes, sendo o interno o menor e o mediano o maior.

Embora este numero de dentes constitua a norma, podem, às vezes, ocorrer variações até no mesmo indivíduo, em que num lado podem existir 4 e no outro 3 dentes inferiores. Mas isto só excepcionalmente.

c) *Escópulas nos tarsos e metatarsos das pernas*:

Todos os tarsos estão inteiramente cobertos de escópulas, muito bem desenvolvidas sob a forma de um tapete aveludado principalmente nos exemplares adultos, enquanto que nos filhotes este tapete é mais ralo e os pelinhos mais esparsos e longos.

Nos metatarsos as escópulas são quase completas nos 2 primeiros pares de pernas; cobrem quatro quintos do artículo no terceiro par e a metade ou mais ou um pouco menos no último par. Nos jovens as escópulas dos metatarsos são muito ralas. Quanto menor a idade, tanto mais as escópulas são substituidas por pelinhos esparsos.

d) *Dorso do abdomen e algumas articulações das pernas, principalmente dos 2 últimos pares, com feixes de pêlos eretos* (vide pranchas coloridas)

Estes feixes de pêlos, si bem que não privativos do gênero, são, contudo raros em aranhas. Em *Enoploctenus* apresentam ou colorido branco ou vermelho sobre fundo cinza verde, azulado ou marrom e ajudam eficientemente a caracterizar este gênero. A semelhança dos pêlos de um pincel estão reunidos em diversos feixes, bem nítidos e de posição simétrica no dorso e nos lados do abdomen, sobresaindo à primeira vista.

b) *Espécies válidas do gênero* Enoploctenus.

As 13 espécies de *Enoploctenus*, descritas até o dia de hoje, não resistem, de maneira alguma, a uma apreciação morfológica comparada, objetiva, pois, por mais se queira manter as mesmas, não se encontram caracteres específicos constantes, que justifiquem sua conservação.

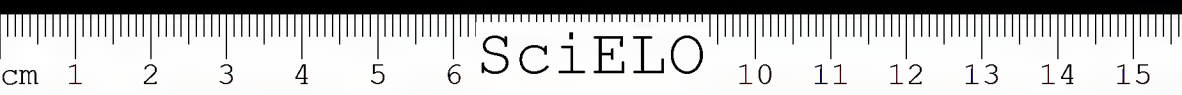
O próprio Strand, que foi o autor de 7 novas espécies, manifesta suas dúvidas a respeito das próprias espécies. Em "Neue oder wenig bekannte neotropische cteniforme Spinnen des Berliner Museums" — Zool. Jahrb. Abt. Syst. 28, 401, 1910, fala entre outras coisas: "*Enoploctenus pedatissimus*..... Ein ganz typischer *Enoploctenus* ist das Tier nicht....; *Enoploctenus* sp. (*janeiroensis* n. sp.) .... Ein junges und nur teilweise erhaltenes Männchen, das ich jedoch, da es sich um eine seltenere Gattung handelt, kurz beschreiben und mit dem provisorischen Namen *janeiroensis* m. belegen möchte. "Trata-se de um macho, ainda filhote, em que falta completamente o abdomen. O autor continua: *E. geralensis*....." Abdomen stark abgerieben, nur mehr als einfarbig zu erkennen (abdomen tão estragado que não mais se distinguem as cores e os desenhos).... *E. [illegible]lipes*.... "Abdomen, hinten, wahrscheinlich weissliche, durch abstehende Haare gebildete, Punkte atrás do abdomen provavelmente com pontuações e feixes de pêlos em forma de pinceis)... *E. zonatulus*.... "Uma fêmea muito jovem".

Deduz-se que nenhuma destas 5 espécies é realmente bem descrita. Nenhuma foi comparada com espécies afins (*germaini* ou *cyclothorax*); nem mesmo entre elas o autor estabeleceu diferenças morfológicas. Do mesmo biotopo (Rio de Janeiro-Monte do Corcovado) e montanhas da Tijuca, tambem Rio de Janeiro ele descreveu um macho filhote (*janeiroensis*) e uma fêmea filhote (*zonatulus*), fazendo 2 espécies novas.

Vejamos os caracteres comparativos das 13 espécies:

	E. cyclothorax (Bertk., 1880)	*E. germaini* Simon, 1896	*E. scopulifer* Str., 1908	*E. pedatissimus* St., 1910
Habitat	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	Joinville	Equador (S. Ignacio)
Compr. total	18,7 mm	21,2 mm	21,50 mm	15 mm
Cefalotórax	7,4: 5,2 mm	7 : 5 mm	10 : 8 mm	7 : 5,5 mm
Perna I e IV	44 —— 43 mm	37 —— 35 mm	39,5 —— 40,3 mm	45 —— 44 mm
Pat. e tib. I e IV	14,2: 13,4 mm	12,6 :10 5 mm	15:13,5 mm	15,5 : 13 mm
Espinhos, femur I	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4
II	1—2+2+3+4	2+2+3+4	2+1—2+3+4	2+2+3+4
III	1—2+2+3+4	2+2+3+4	2+1—2+3+4	2+2+3+4
IV	2+2+3+3—4	2+2+3+3—4	2+2+3+3—4	2+2+3+ ?
patelas	0	0	0	1 a 2 em cada
tibia I	7 p.v.+0 ant.+2 post.	7p.+0+2	7p.+2+2	6 p.+1+1—2+ 3 sup.
II	7 p.v.+0 ant.+2 "	7p.+0+2	7p.+2+2	6 p.+1+2+ 3 sup.
III	3 p.v.+2 ant.+2 +1 sup.	3p.+2+2+1	3p.+2+2+1	3 p.+2+2+2
IV	3p+2+1	3p.+2+2+1	3p.+2+2+1	3 p.+2+2+1—2
metarsos I	3 p.v.+1 ant.+1 post.	3p.+1+1	3 p.+1+1	3 p.+1+1
II	3 p.v.+1 ant.+1 post.	3p.+1+1	3 p.+1+1	3 p.+1+1
III	4 p.v.+3 ant.+3 post.	4p.+3+3—2	4 p.+3+3—2	4 p.+3 3—2
IV	4 p.v.+2 3 " +2—4 " +1 cup.	4p.+2—3+2—4+1	4 p.+2 3+3+2	4 p.+3 3+4
Escópulas metatars. I	quase totais	quase totais	quase totais	quase totais
II	idem	idem	idem	idem
III	a metade	a metade	a metade	a metade
IV	um terço apical	um terço apical	um terço apical	um terço apical
Margem sup. das quelíc.	4 dentes, o 4.º isol.	3 dentes	3 dentes	3 dentes
Margem inf. das quelíc.	3 dentes contiguos	4 dentes	4 dentes	4 dentes
Espinhos nos palpos femur	1+4	1 3—4	1+3—4	1+3—4
patelas	1	1	1	1
tibia	2+2—3+1	2+2—3+1	2+2—3+1	2+2—3+1
tarso	2+1	2+1	2+1	2+1
Colorido cefalot.	cinza amarelo	cinza amarelo, avermelhado	cinza amarelo	cinza amarelo
pernas	com manchinhas negras	amarelas vermelhas	amarelas vermelhas	amarelas vermelhas
ventre	3 faixas + 5 estrias	3—5 estrias	3—5 estrias	4—5 estrias
abdomen	manchas e feixes pil.	manchas e feixes	manchas	manchas
Exemplar descrito		1 fêmea	1 fêmea	1 macho, filhote
4 olhos medianos	iguais e equidistantes	iguais e equistantes um nada mais afastados	iguais e equidistantes	iguais; posteriormente mais afastados

	E. geralensis Str., 1910	*E. janeiroensis* Str., 1910	*E. maculipes* Str., 1910	*E. zonatulus* Str., 1910	*E. wolfi* Str., 1915
Habitat	Rio de Janeiro	Serra do Mar	Minas Gerais	Rio de Janeiro	Joinville
Compr. total	10 mm	24,9 mm		22 mm	
Cefalotórax	8 : 5 mm	9,5 : 8 mm	7,5 : 6 mm	10 : 8,5 mm	8 : 6,5 mm
Perna I e IV	44,5 ——	45 —— 4,5 mm	36 —— 38,8 mm	39 —— 38,,mm	31 —— 31 mm
Pat. e tib. I e IV	17 : ??	17,5 : 14,5 mm	13.5: 11.8 mm	15 : 12mm	12:10 mm
Espinhos, femur I	3+3+3	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4
II	3+3+3	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4
III	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4	2+2+3+4
IV	2+2+3+3—4	2+2+3+3—4	2+2+3+3—4	2+2+3+3 ??	2+2+3+3
patelas					
tibia I	7 p.v.+0—2+0—2	7 p.+1+2+0—2 sup.	7 p.+0—2+2	7 p.+0+2	7 p.+0+1—2
II	idem	idem	idem	idem	idem
III	3 p.v.+1+1—2	3 p.v.+1+1+1 sup.	3 p.v.+1+1+1 sup.	3 p.v.+1+1+1 sup.	3 p.v.+1+1+1 sup.
IV	3 p.v.+1—2+2+1—2 sup.	3 p.v.+2+2+2 sup.	3 p.v.+2+2+1—2 sup.	3 p.v.+2+2+2 sup.	3 p.v.+2+2+2—3 sup.
metarsos I	3 p.v.+1 ant.+1 post.	3 p.v.+1+1	3 p.v.+1+1	3 p.v.+1+1	3 p.v.+1+1
II	idem	idem	idem	idem	idem
III	4 p.v.+3 a.+3 p.+1—2 s.	4 p.v.+3+3+2—3	4 p.v.+3+3+1—3	4 p.v.+3+3+1—3	4 p.v.+3+3+1—3 sup.
IV	idem	idem	idem	idem	idem
Escópulas metatars. I	quase totais	quase totais	quase totais	quase totais	quase totais
II	idem	idem	idem	idem	idem
III	a metade	a metade	a metade	a metade	a metade
IV	um terço apical	um terço apical	um terço apical	um terço apical	um terço apical
Margem sup. das quelíc.	3 dentes	3 dentes	3 dentes	3 dentes	3 dentes
Margem inf. das quelíc.	4 "	4 "	4 "	4 "	4 "
Espinhos nos palpos femur	1+4	1+3—4	1	1+4	1+3—4
patelas	1	1	1+3—4	1	1
tibia	2+2—3+1	2+2—3+1	2+2—3+1	2+2—3+1	2+2—3+1
tarso	2+1	2+1	2+1	2+1	2+1
Colorido cefalot.	amarelo sujo	amarelo sujo	amarelo sujo	amarelo sujo	amarelo sujo
pernas	manchas negras	manchas negras	manchas negras	manchas negras	manchas negras
ventre	????	????	sem estrias	faixas e estrias	faixas e estrias
abdomen	????	????	manchas e feixes	faixas, manchas e feixes	faixas, manchas e feixes
Exemplar descrito	macho filhote	fêmea adulta	fêmea	fêmea jovem	fêmea jovem
4 olhos medianos	iguais e equidistantes	iguais; post. um nada mais afastados	iguais e quase equidistantes	iguais e quase equidistantes	quase iguais e equidistantes

	E. fallax M. L., 1922	*E. rondini* M. L., 1922	*E. strandi* M. L., 1936	*E. morbidus* M. L., 1939
Habitat	Minas Gerais	Mato Grosso	Ouro Preto, Minas	Mato Grosso (Salobra)
Compr. total	17 mm-juvenis	29 mm	???	14 mm-juvenis
Cefalotórax	???	???	???	???
Perna I e IV	37 —— 40 mm	43 —— 44 mm	35 —— 35,5 mm	37,4 —— 36,4 mm
Pat. e tib. I e IV	???	???	13,5 : 11 mm	14,2 : 11,4 mm
Espinhos, femur I	???	???	???	???
II	???	???	???	???
III	???	???	???	???
IV	???	???	???	???
patelas	?	?	?	?
tibia I	7 p.v.+0+1—2	7 p.+1—2+1—2	7 p.v.+1+1	6 p.v.+4+4+3 sup.
II	7 p.+1+2	7 p.+1+1—2	7 p.v.+1+1	6 p.v.+2+3+5 sup.
III	???	???	???	???
IV	???	???	???	???
metarsos I	3 p.v.+1+1	3 p.v.+1+0—1	3 p.v.+1+0—1	6 pares (?)+3+3
II	3 +1+1	3 +1+1	3 p.v.+1+1	4 " +0+?
III	???	???	???	???
IV	???	???	???	???
Escópulas metatars. I	não consta	não consta	até a base	não consta
II	não consta	não consta	até a base	não consta
III	" "	" "	não consta	" "
IV	" "	" "	" "	" "
Margem sup. das quelíc.	3 dentes	3 dentes	3 dentes	3 dentes
Margem inf. das quelíc.	4 dentes	4 dentes	4 dentes	4 dentes
Espinhos nos palpos femur	não consta	não consta	não consta	não consta
patelas	" "	" "	" "	" "
tibia	" "	" "	" "	" "
tarso	" "	" "	" "	" "
Colorido cefalot.	cinza amarelo	cinza amarelo	cinza amarelo	cinza amarelo-pardo
pernas	manchas negras	manchas negras	manchas negras	manchas negras, irregulares
ventre	sem estrias	não consta	sem estrias	não consta
abdomen	não consta	não consta	não consta	cinza escuro
Exemplar descrito	1 fêmea	1 fêmea	1 macho	1 macho
4 olhos medianos	iguais; anteriores um	idem	idem	iguais; posteriores um pouco mais afastados

Pelo confronto atento dos dados da tabela comparada chegamos às seguintes conclusões:

a) Os *Enoploctenideos* das montanhas em redor da cidade do Rio de Janeiro (*cyclothorax-germaini-janeiroensis-geralensis* e *zonatulus*) pertencem indubitavelmente à mesma espécie.

Apresentam o mesmo número de espinhos nos fêmures, isto é, no lado anterior 2 espinhos menores, mais afastados e 2 mais longos e mais próximos, superiores; no lado superior 3 espinhos e no lado posterior 4. Nas tíbias dos 2 primeiros pares existem 6 pares de espinhos inferiores, longos, enfileirados e mais um 7.º par, distal, bem curto (que pode faltar no 1.º par). Na face anterior ou não há espinho-o que é quase a regra-ou existe 1, raras vezes 2. Na face posterior sempre existem dois. Nas tibias do 3.º e 4.º par de pernas existem sempre 3 pares de espinhos ventrais, 2 anteriores, 2 posteriores e 1-2 superiores. No 4.º par pode haver certa posição irregular, nos espinhos laterais e superiores.

Nos metatarsos dos 2 primeiros pares de pernas encontram-se sempre 3 pares de longos espinhos enfileirados, inferiores, 1 anterior e 1 posterior.

No 3.º e 4.º par de pernas existem 4 pares inferiores, isto é, os 3 pares de sempre, mais um 4.º par distal, menor, 3 anteriores, 3 posteriores e 0-2 superiores, espinhos estes bastante irregulares no 4.º metatarso, onde seu número não é tão constante.

Os espinhos dos palpos se distribuem da seguinte maneira: no fêmur 1+3—4; na tibia 2+2—3+1, no tarsos 2+1 e nas patelas somente 1.

O colorido *das* 5 espécies é também idêntico, si bem que possam existir certas tonalidades para o claro ou escuro ou ainda o tom cinza verde, variantes de individuo para individuo (vide pranchas coloridas). O *abdomen* apresenta no meio uma estria avermelhada, estreita e curta. Ao lado das estrias ha uma orla amarelada que se prolonga para trás, nos dois lados, abrindo-se na segunda metade numa grande mancha triangular. Atrás desta há u'a mancha menor, também transversal. Nos lados, na segunda metade do abdomen, existem 3 a 5 feixes de pêlos claros, densos e eretos, como tufos. Segundo o ambiente em que a aranha vive, pode predominar no dorso do abdomen, alem dos desenhos já mencionados, um belo colorido esverdeado, a imitar musgo e pedra (mimetismo), substituido por tonalidades cinza marrons em individuos que habitam em terreno mais arenoso (vide as pranchas coloridas).

No *ventre* todas as 5 espécies acima enumeradas apresentam 3 campos escuros, margeados por 5 faixas claras, formadas por tufos de pelinhos cinzentos. Estas faixas convergem atrás. Os tufos de pelinhos sempre são reunidos em feixes, de maneira que aparece entre eles o campo escuro, de fundo, dando o conjunto das faixas a impressão de colares enfileirados. Os tufos

de pelinhos nascem sobre plaquinhas de quitina mais reforçada, bem visíveis em aranhas, em que se raspam os tufos ou que, pela longa conservação em meio alcoólico, ficaram descoradas (veja o colorido pelas pranchas e os ornamentos e estrias no ventre pelas figs. 13-17).

O número das estrias ventrais varia, entretanto, dentro da mesma espécie, principalmente segundo a idade do indivíduo. Também a intensidade do colorido está sujeita a nuances, dependentes do ambiente em que vive a aranha na natureza e segundo a idade do indivíduo e o tempo decorrido desde a última muda de pele.

A comparação das figuras 13-17 permite apreciar esta variação. A fig. 13 apresenta o ventre de um exemplar adulto (também reproduzido pela foto N.º 4 e as pranchas coloridas). Na fig. 14 já estão ausentes as duas estrias laterais incompletas. Na fig. 15 somente as duas estrias centrais têm pontuações. Na fig. 16 já não existem estrias longitudinais, mas apenas pontuações e na fig. 17 não vemos mais pontuações, sendo as próprias estrias quase apagadas. Entretanto, todas estas figuras (de 13-17) bem como as pranchas coloridas e a foto 4 retratam indivíduos, sempre da mesma espécie, procendentes de um lote da Ilha de São Sebastião.

Estamos insistindo nesta variação de colorido, porque C. Mello-Leitão (*loc. cit.*) tentou estabelecer uma chave sistemática das espécies do gênero, baseando-se quase exclusivamente nesta variação, atribuindo-lhes valor específico. Aliás, no gênero *Enoploctenus*, mais do que em aranhas de qualquer outro gênero, descoram-se facilmente os pêlos pela conservação alcoólica, não se podendo distinguir em indivíduos, guardados durante anos, os matizes verdes, cinzas, róseos do dorso do cefalotorax e abdomen. No ventre empalidecem as estrias e faixas, de maneira que a aranha aparece de uma só côr.

Em vista disto não é admissível estabelecer-se uma chave sistemática, diferenciando-se 11 espécies, sem tomar em consideração outro caracter além de nuances de colorido.

Os próprios autores das diferentes espécies, como E. Simon (*E. germaini*) e E. Strand (*janeiroensis, geralensis, zonatulus*), revendo as coleções aracnológicas de museus europeus somente longos anos depois de as aranhas terem sido coletadas por viajantes, que costumavam passar longos anos no Brasil (V. Ihering; Goeldi; Natterer) não mais podiam ver as côres e os desenhos naturais das aranhas, descrevendo-as erroneamente de uma só côr.

Segundo Mello-Leitão, em sua chave de diferentes coloridos, *E. zonatulus* teria as linhas do ventre formadas por pêlos brancos em fundo cinza, enquanto que *cyclothorax, germaini, janeiroensis* e *geralensis* não possuiam estrias no ventre, mas um só colorido uniforme ou mais escuro que o do dorso. Mello-Leitão parece não ter visto a *janeiroensis*. Admira, pois, ter-lhe atribuido um

Mem. Inst. Butantan,
23 : 1-44, Nov.º 1950.

ventre concolor, quando Strand, autor desta espécie, diz: "Abdomen fehlt" (abdomen ausente).

Segundo a chave de C. Mello-Leitão a espécie *E. germaini* apresentaria também um ventre concolor. Entretanto, o mesmo autor determinou em 1921, como sendo *gemaini* o exemplar de N.º 569, depositado no Departamento de Zoologia, em São Paulo, Brasil, cujo ventre ainda hoje apresenta 3 campos escuros, entrecortados por 5 estrias longitudinais, em tudo iguais ao desenho 14, e à foto N.º 4.

O "mimetismo" é outro fator a explicar a diversidade de colorido, principalmente das coberturas superiores do corpo. Na prancha colorida vêm-se dois aspectos de uma fêmea, de São Sebastião, que foi capturada em terreno rochoso, coberto de musgo. A cobertura superior da aranha acompanha este colorido, ao passo que se distingue chocantemente do colorido do ventre.

A todo este grupo de 5 "espécies" é também comum o mesmo colorido das pernas, muito fielmente representado pela prancha colorida da fêmea. Há nos fêmures, nas tíbias e nos metatarsos 2 a 3 manchas escuras sobre fundo amarelo. Nos fêmures estas manchas costumam ser tres, uma pequena, basal u'a maior mediana e outra, também relativamente grande, sub-apical.

As mesmas tres manchas escuras se vêm nas tíbias, onde a sub-apical é a maior. Nos metatarsos há apenas duas manchas. O fundo amarelo está coberto por pelinhos cinza amarelados, entremeados de pelos finos, muito longos, cinzentos, iguais aos representados nos palpos dos machos, nas figuras 10, 11 e 12. Nas tíbias e nos metatarsos há, além disto, feixes circulares de pêlos longos, róseos, muito densos, particularmente pronunciados nos dois últimos pares de pernas-feixes estes da mesma natureza e do mesmo colorido, róseo, dos existentes no dorso do abdomen (prancha colorida).

Na região frontal, em volta das queliceras, há uma area ornada de pelinhos vermelhos.

Todos estes caracteres morfológicos comuns (dimensões, espinhos, colorido, habitat) nos obrigam a reunir estas 5 espécies em uma só. Abstraindo-se os caracteres genéricos, comuns a todas as espécies do gênero, nada resta que permita a um investigador objetivo separar especificamente estas espécies. Apresentam o mesmo habitat (regiões montanhosas em volta da Capital, Rio de Janeiro, com irradiação para os picos altos do mesmo biotopo — Serra do Mar, até Paraná-Ilha de São Sebastião); as mesmas relações mesurais nos comprimentos da 1.ª e 4.ª perna, da patela e tíbia I e IV; a mesma relação mesural entre o comprimento e a largura do cefalotorax. A estensão das escópulas nos metatarsos é francamente a mesma, embora E. Simon, ao descrever o genotipo "germaini", lhe tenha atribuido uma área escopulada muito pequena. É que os pelinhos das escópulas se desprendem facilmente, quando a aranha está

conservada em álcool por muito tempo. O exemplar, que foi descrito por Simon, ainda não era completamente adulto, sendo um fato sabido e comum que nos filhotes as escópulas nunca chegam à completa evolução. Nos exemplares muito jovens as escópulas metatarsais são praticamente inexistentes. Nestes indivíduos, nos próprios tarsos, existem fileiras longitudinais de cerdas, em uma a duas linhas sómente no primeiro tarso, em 2-3 linhas no tarso do segundo par, em 4-5 linhas longitudinais no tarso do terceiro par e ocupando a area escopulada inteira no último par.

Quanto ao resto, *janeiroensis* não tem justificativa específica, pois o próprio autor diz: — "Um macho filhote e parcialmente danificado, para o qual — como se trata de um gênero raro-proporia o nome provisório de *janeiroensis*".

O mesmo autor descreveu *geralensis* como espécie nova, porque, pela primeira vez para todas as espécies deste gênero, foi-lhe dado, então ver a formação nítida do epígino completamente evoluido. Seus predecessores, Simon, com a especie *germaini*, Bertkau com *cyclothorax*, não deram muita atenção a este orgão feminino, descrevendo-o o primeiro muito por alto e silenciando o segundo.

Foi-nos possível observar a evolução do epígino, desde seus começos rudimentares até sua completa formação, numa grande série de indivíduos da mesma espécie, procedentes do mesmo local, a começar de filhotes com pouca idade (Figs. 21 e 22), jovens já mais idosos (fig. 20), individuos em idade "pre-sexual" (fig. 19) até fêmeas adultas (fig. 18).

Comparando diversas fêmeas adultas da coleção do Instituto Butantan, como a de N.º 940, classificada por Mello-Leitão, em 1935, como *E. scopulifer*, a de N.º 942, determinada pelo mesmo autor, no mesmo ano, como *E. zonatulus*, a de N.º 943, determinada pelo mesmo, na mesma ocasião, como *E. germaini*, e as de Nos. 973 e 974, classificadas por J. Vellard como *Ctenus rufibarbis*, confirmou-se em nós a convicção de que os autores citados não dispunham de maneira alguma de um critério objetivo para as determinações; do outro lado pudemos ver sempre um epígino completamente idêntico ao da fig. 18.

Não é admissível estabelecer-se uma espécie nova, baseando-se no epigino, a quem no maximo poderá ser concedido valor genérico.

Geralensis, em todo o resto, não se distingue do grupo *janeiroensis*, *germaini* e *cyclothorax*.

E. zonatulus foi descrita como espécie nova à mão de uma fêmea ainda jovem, sem formação típica do epígino, embora o autor já assinalasse que o exemplar media 22 mm de comprimento. Nesta espécie Strand conseguiu observar o colorido natural em todas as nuances-o que não lhe era dado nas outras espécies. Não teve dúvida em estabelecer uma espécie nova, embora o indivíduo fosse apenas filhote e igual nas mesurações, no número de espinhos, etc.., a *maculipes*.

As cinco espécies, *E. cyclothorax* (Bertk, 1880), *germaini* Simon, 1896, *janeiroensis* Strand, 1910, *geralensis* Str. 1910 e *zonatulus* Str., 1910, todas do mesmo bio-topo, isto é, das montanhas da Serra do Mar, particularmente em volta do Rio de Janeiro (Petrópolis, Terezópolis, Corcovado, Tijuca), são, pois, indubitavelmente, uma só especie, para a qual deve prevalecer o nome de *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880).

Exemplares da mesma espécie foram recebidos da Ilha de São Sebastião, em grande número, da Serra da Mantiqueira, das encostas da Serra do Mar, entre São Paulo e Santos. O próprio Mello-Leitão assinalou exemplares, por ele julgados idênticos à especie *germaini*, para os Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais (sul), São Paulo (leste) e Paraná, de maneira que se pode concluir que *E. cyclothorax* constitui o Enoploctenidio mais freqüente do gênero.

Nos arredores de Joinville, Estado do Paraná, Brasil, foram descritas duas outras espécies: a *E. scopulifer* Str., em 1908 e a *E. wolfi* Str., em 1915. Pelos dados, aduzidos para as duas espécies na tabela comparativa, não resta dúvida de que as duas espécies são absolutamente sinônimas. O próprio Strand considera o colorido dorsal de *wolfi* "muito parecido com o de *scopulifer*". Quanto ao epígino diz "ser do tipo comum das fêmeas do gênero".

Uma prova a mais da sinonímia das duas espécies é o fato de Strand ter descrito na mesma ocasião e do mesmo local um macho "com o colorido quase idêntico ao de *scopulifer*", não sabendo ele mesmo solucionar, si este macho pertenceria a *scopulifer* ou a *wolfi*.

Na coleção do Instituto Butantan encontram-se 5 exemplares, uma fêmea adulta N.° 940), procedente de Lagoa, Estado de Santa Catarina e mais 4 exemplares de João Eugenio, Estado do Paraná. Os últimos se dividem em 2 fêmeas adultas, 1 fêmea jovem e um macho filhote. Os 4 exemplares, bem como o de N.° 940, são completamente idênticos com *E. cyclothorax*, de maneira que se confirma que também estas duas espécies, *scopulifer* e *wolfi*, são sinônimas com *E. cyclothorax*. As relações mesurais das pernas, das patelas e tíbias, do cefalotorax, a escopulação dos metatarsos, o número e a posição dos espinhos nas pernas, não as diferenciam desta última espécie.

Strand, ao descrever a espécie *scopulifer*, em 1908, só conhecia para o gênero uma única espécie, esta procedente do Rio de Janeiro, a *germaini* de Simon. Como Simon não tivesse encontrado escópulas bem formadas em seu exemplar (pelas razões já expostas), julgou Strand, poder estabelecer uma nova espécie-a segunda no gênero-cujo caracteristico específico repousava justamente na presença de escópulas nos metatarsos das pernas. *E. cyclothorax* não foi considerada por Strand, porque era tida ainda como *Ctenus*.

b) *Enoploctenus pedatissimus* Strand, 1910, embora apresente as mesmas relações mesurais do cefalotorax, das pernas, das patelas e tibias, a mesma posição dos 4 olhos medianos, a mesma espinulação nos articulos dos palpos, as mesmas áreas escopuladas nos metatarsos como *E. cyclothorax* e embora a espécie repouse sobre um tipo, manifestamente ainda não adulto (apenas com 15 mm de comprimento total, quando a média de um exemplar adulto é de 22 mm ou mais), poderá, contudo, ser conservado como espécie, tomando-se em consideração o "habitat", que é Santo Inacio, Ecuador e, antes de tudo, o fato de apresentar também espinhos nas patelas das pernas locomotoras, como também no lado superior das tibias dos dois primeiros pares de patas. Em nenhuma espécie brasileira do gênero temos constatado estes espinhos.

Contudo deverá esta espécie ser confirmada pela redescrição de um macho bem adulto e principalmente tambem pela descrição da fêmea, até hoje ainda desconhecida.

O próprio Strand diz "...Ein typischer Enoploctenus ist das Tier nicht"... (o exemplar não é um *Enoploctenidio* típico). No colorido descrito sobresai, antes de tudo, uma faixa clara, amarela a percorrer o cefalotorax e, pelo menos, a porção anterior do abdomen. Ora, temos examinado uma espécie afim, do gênero *Acanthoctenus*, pertencente à familia *ACANTHOCTENIDAE*, que é quase igual a *Enoploctenus*, abstraindo a presença do *cribellum* e do *calamistrum*, órgãos não poucas vezes de dificil apreciação. O dorso é percorrido pela estria amarelo-clara; há espinhos nas patelas; o cefalotorax apresenta região frontal bem mais elevada do que a torácica; os 4 olhos medianos formam um quadrilatero, si bem que geralmente mais largo atrás do que na frente.

c) O grupo de *Enoploctenideos* de Minas Gerais — *maculipes* Strand, 1910, *fallax* Mello-Leitão, 1922 e *strandi* Mello-Leitão, 1936, formam igualmente uma só espécie, cujo nome definitivo deverá ser *Enoploctenus maculipes* Strand, 1910.

Pela tabela comparativa ressalta o caráter especifico principal das tres formas: — o comprimento maior da 4.ª perna em relação à la, enquanto que em *cyclothorax* e *pedatissimus* a 1.ª perna é significativamente mais longa do que a IV ou então ambas são iguais em comprimento. Além deste caráter há ainda o colorido que, de qualquer modo, permite reunir as três espécies numa só e diferenciar esta de *cyclothorax*. O colorido é menos variável, não havendo no dorso do abdomen nem nas pernas os feixes de pêlos côr de rosa. As pernas desta espécie são muito menos pilosas, vendo-se nitidamente numerosas e pequenas manchas pretas em fundo amarelo, enquanto que em *cyclothorax* estas manchas são maiores, apenas 2 ou 3 em cada artículo e de posição bem definida.

O epígino de *maculipes* nada oferece de especificamente interessante. O próprio Strand diz que é quase idêntico ao de *geralensis*.

Mello-Leitão, na espécie *fallax* diz que o epígino é nigerrimo, cêrca de duas vezes mais largo que longo, com dois tubérculos posteriores. Mas isto é justamente a caracterização geral de todos os epíginos do gênero. As trabéculas quitinosas, laterais, são pretas; os dois espinhos das azas laterais são elevados, simulando dois tubérculos (figs. 18-22). Quanto à largura e o comprimento prevalece sempre a primeira. Existe na coleção do Instituto Butantan uma fêmea adulta, procedente de Mariana, Estado de Minas Gerais (local-tipo de *fallax*), cujo epigino é absolutamente normal (Fêmea N.º 941).

Quanto à descrição original de *strandi*, Mello Leitão não se deu ao trabalho de fazê-la completa. Nada se diz sobre o número exato de espinhos nos fêmures, nas tibias, nos metatarsos das pernas, nem dos palpos; nada é dito sôbre as escópulas e sua extensão nos metatarsos; tão pouco a nova espécie é confrontada com qualquer outra do gênero, sendo a descrição exatamente suficiente para se ver apenas que o exemplar é realmente um *Enoplocteniideo*.

A rigor dever-se-ia aduzir esta espécie como sendo um "*nomen nudum*", mas pareceu-nos melhor reunir *strandi*, *fallax* e *maculipes* numa só, sob o nome de *maculipes*, baseados no mesmo habitat, no colorido idêntico e no mesmo comprimento das pernas I e IV.

A espécie, *Enoploctenus rondoni*, descrita por Mello-Leitão de Mato Grosso, em nada se distingue do grupo de Minas Gerais. O 4.º par de pernas é mais longo que o 1.º, o colorido também não diverge: o epiginio tem exatamente a forma típica do gênero.

Infelizmente foi o autor bastante lacônico na descrição original. Não relata as medidas das patelas e tíbias, nem do cefalotorax: nada consta sobre o numero de espinhos nos fêmures, nos metatarsos e nas tíbias dos 2 últimos pares de pernas.

Pela nossa tabela comparada se pode inferir que não há realmente caráter algum de natureza morfológica, que dê cunho específico, de maneira que associamos esta espécie também ao grupo de *maculipes*, declarando seu nome sinónimo a este. Isto ainda mais, porque o A., ao descrever esta espécie, não é mais explicito.

d) A última espécie do gênero, *Enoploctenus morbidus* Mello-Leitão, 1939, descrito pelo Autor como procedente de Salobra, Mato Grosso, é realmente uma espécie boa, enquanto se pode julgar pela descrição grandemente insuficiente (faltam as medidas do cefalotorax, os espinhos nos fêmures e nos artículos dos

palpos. Nada foi referido sobre a extensão das áreas escopuladas dos metatarsos). O lado inferior dos metatarsos do 1.º par de pernas foi referido como tendo 6 pares de espinhos — o que deve ser um êrro de impressão, pois sempre são apenas 3 pares.

O que nos faz conservar esta espécie é o número de espinhos nas tíbias e nos metatarsos dos primeiros dois pares de pernas. Nas tíbias, além dos 6 páres inferiores, existem 3 anteriores perto da face dorsal e 4 anteriores, mais ventrais e ainda 4 posteriores. Nos metatarsos 3 a 4 pares inferiores, 3 anteriores e 3 posteriores. Nas tíbias do 2.º par existem 6 pares de espinhos inferiores, 5 anteriores superiores, 2 anteriores inferiores e 3 posteriores.

Este número de espinhos é realmente único em todas as espécies do gênero e justifica a espécie, definitivamente estabelecida quando for encontrada a fêmea.

CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

As 13 espécies do gênero sul-americano, *Enoploctenus,* foram revistas criticamente. Com os numerosos exemplares da coleção do Instituto Butantan foi-nos possível traçar novos critérios para a morfologia externa deste gênero. Revendo, então, os exemplares, por outros autores, como Mello-Leitão e Vellard, já classificados e depositados no Instituto, na mesma coleção, nos foi possivel estabelecer uma tabela comparada, onde são demonstrados os caracteres flutuantes de antigamente e sua insuficiencia completa na discriminação das espécies.

Reunimos, então, em apenas 4 espécies todas as outras, deste grupo. Não mais nos baseamos nos critérios antigos — posição dos 4 olhos medianos; curvatura diferente das fileiras dos olhos; extensão das escópulas nos metatarsos, etc... porque temos visto que estes caracteres só têm valor genérico. Também não seguimos o método adotado por C. Mello-Leitão, que deu valor decisivo específico ao colorido.

As 4 espécies válidas do gênero são discriminadas:

a) Perna I um pouco mais curta ou igual à perna IV. Ventre com fileiras de estrias; dorso do abdomen com feixes de pêlos eretos, presentes igualmente em tôrno das articulações da tíbias e dos metatarsos das pernas, particularmente dos dois últimos pares — *E. cyclothorax.*

b) Perna IV mais longa que a I. Ventre sem estrias; dorso e pernas sem feixes de pêlos — *E. maculipes.*

c) Com um a dois espinhos também nas patelas das pernas ambulatórias; espinhos presentes também no lado superior das tíbias dos dois primeiros pares de pernas — *E. pedatissimus.*

d) Face anterior das tíbias dos 2 primeiros pares de pernas com 6-8 espinhos; metatarsos com 3-4 anteriores e 3 posteriores — *E. morbidus*.

Temos a constatar que não nos foi possível obter dados biométricos decisivos, que permitissem uma nítida separação de espécies. Medimos em grandes séries o comprimento do cefalotorax e sua largura, os comprimentos das patelas e tíbias das pernas, o comprimento dos 4 metatarsos, o comprimento das 4 pernas, sem que encontrassemos uma referência mesural decisiva ou mesmo significativa para a discriminação de espécies. Mesmo nas 4 espécies, que julgamos definitivas, não existem diferenças específicas mesurais, exceção feita em duas com relação ao comprimento do 1.º e do 4.º par de pernas (*cyclothorax* e *maculipes*).

As outras duas espécies (*pedatissimus* e *morbidus*) estão documentadas de um lado pela presença de espinhos nas patelas (o que não mais ocorre em nenhuma outra espécie) e por outro pelo grande número de espinhos laterais nos primeiros 2 pares de pernas (o que é igualmente um fato novo no gênero).

A estes caracteres diferenciais unem-se como tendo valor secundário específico, as diferenças de colorido, particularmente estrias no ventre e feixes de pêlos no dorso do abdomen e nas pernas (*cyclothorax*), ausência destes feixes e das estrias (*maculipes*). As duas espécies se diferenciam ainda pela presença de manchas grandes, escuras, em número de 2 a 3 nos artículos das pernas em *cyclothorax*, enquanto que as pernas de *maculipes* ostentam inúmeras manchinhas negras em fundo amarelo.

As restantes espécies, em número de 9, postas em sinonímia com as presentes, realmente não apresentam nada que justificasse sua conservação. O material, descrito por Strand e depositado no Museu de Berlim, era absolutamente mal conservado; ora faltavam pernas, ora o abdomen; quase sempre era impossível reconhecer o colorido original, de maneira que o autor foi forçado a empregar em suas descrições originais, os termos "parece — pode ser, etc"..., enfim termos impróprios em descrições de primeira mão, de espécies novas. Acresce ainda que tanto ele, quanto E. Simon, descreviam espécies novas mesmo com filhotes. Também não se davam conta muitas vezes sobre o sexo oposto, descrevendo macho e fêmea como espécies diversas.

RESUMO

As 13 espécies do gênero *Enoploctenus* são revistas criticamente, estabelecendo-se, em logar dos critérios antigos, reconhecidos como falhos, bases novas para sua morfologia comparada. Segundo este novo métododo são consideradas válidas apenas 4 espécies, cuja relação é a seguinte:

Enoploctenus cyclothorax (Bertkau), 1880

Sinonimas: — *E. germaini* Simon, 1896
E. janeirensis Strand, 1910
E. zonatulus Strand, 1910
E. scopulifer Strand, 1910
E. wolfi Strand, 1915.

Enoploctenus pedatissimus Strand, 1910.

Enoploctenus maculipes Strand, 1910.

Sinônimas: — *E. fallax* C. Mello-Leitão, 1922.
E. strandi C. Mello-Leitão, 1936.
E. rondoni C. Mello-Leitão, 1922.

Enoploctenus morbidus C. Mello-Leitão, 1939.

ZUSAMMENFASSUNG

Die 13, bisher bekannten, Arten der südamerikanischen Spinnen-gattung *Enoploctenus (Ctenidae, Acantheinae)* wurden einer vergleichend morphologischen Untersuchung unterzogen. Als Vergleichsmaterial dienten dabei die an die Zahl 100 grenzenden Individuen der Spinnensammlung des Institutes Butantan, von denen einige wenige Exemplare schon vor Jahren von J. Vellard und C. Mello-Leitão bestimmt worden waren.

Eingangs wurden die bisher üblichen Art spezifischen Merkmkale auf ihre Gültigkeit untersucht und dabei einwandfrei festgestellt, dass die meisten Merkmale, die gerade von Strand, Mello Leitão, Simon, als von Art entscheidender Wichtigkeit beschrieben worden waren, nichts weiter sind als nur generische Merkmale.

Es wurde auch verschiedene Male im Text auf die Arbeiten Strands hingewiesen und gezeigt, wie er an Hand von nur ganz wenigen Exemplaren, die meistens noch dazu im defekten Zustande im Berliner Museum vorlagen, 6 neue Arten beschrieben hatte, die alle mehr oder weniger als synonym anzusehen sind.

Anschliessend ein Verzeichnis der gültigen und der synonymen Arten:

GÜLTIG	SYNONYM
1. *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880)	a) *E. germaini Simon*, 1896
	b) *E. janeiroensis* Strand, 1910
	c) *E. geralensis* Strand, 1910
	d) *E. zontulus* Strand, 1910
	e) *E. wolfi Strand*, 1915

2. *Enoploctenus pedatissimus* Strand, 1910
3. *Enoploctenus maculipes* Strand, 1910
   - f) *E. fallax* Mello Leitão, 1922
   - g) *E. strandi* " " 1936
   - h) *E. rondoni* " " 1922
4. *Enoploctenus morbidus* Mello-Leitão, 1939.

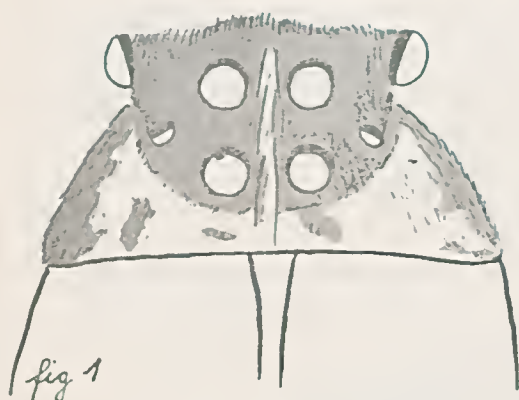
BIBLIOGRAFIA

1. *Petrunkevitch, A.* — Systema aranearum — Trans. Conn. Acad. of Arts and Science, 29. 1928.
2. *Simon, E.* — Hist. Nat. Ar. II, 117. 1897.
3. *Strand, E.* — Zool. Jahrb. Abt. Syst. **28**, 401, 1910.
4. *Simon. E.* — Ann. Soc. Entom. France, **65**. 495, 1896.
5. *Mello-Leitão, C.* — Arch. Inst. Biol. São Paulo, **11**, 242, 1940
6. *Strand, E.* — Zool. Anz. **33**, 6, 1908.
7. *Strand, E.* — Zool. Jahrb. Abt. Syst. **28**. 415. 1910.
8. *idem — ibidem*, pag. 422.
9. *Mello-Leitão, C.* — Bol. Biol. **4**. 2, 287, 1939.
10. *Mello-Leitão, C.* — Arch. Esc. Sup. Agr. Med. Vet. **6**, 42, 1922.
11. *idem-bidem.*
12. *Bertkau, C.* — Verz. Bras. Arachn. pag. 56 (*Ctenus c.*), 1880.
13. *Strand, E.* — Arch. f. Naturgesch. **9**, 133, 1915.
14. *Mello-Leitão, C.* — Festschrift Embrik Strand, 24, 1936.

SUMMARY

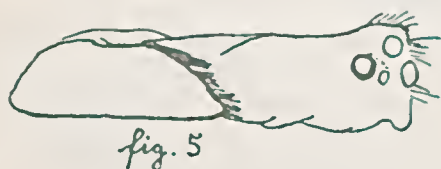
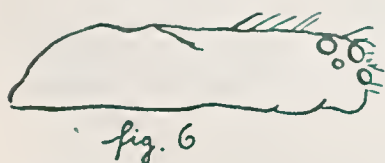
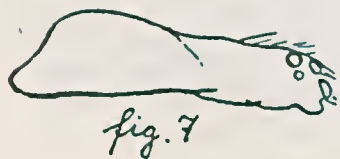
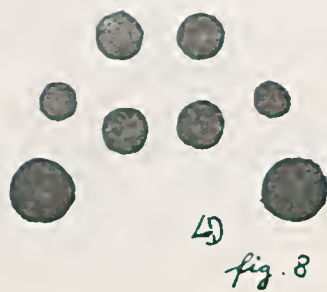
The known 13 species of the genus *Enoploctenus (Ctenidae, Acantheinae)* are comparatively studied and reduzed to the following 4 species:

GOOD SPECIES	SYNONYMIC SPECIES
1. *Enoploctenus cyclothorax* (Bertkau, 1880)	a) *E. germaini* Simon, 1896
	b) *E. janeiroensis* Strand, 1910
	c) *E. geralensis* Strand, 1910
	d) *E. zontulus Strand*, 1910
	e) *E. wolfi* Strand, 1915
2 *Enoploctenus pedatissimus* Strand, 1910	
3. *Enoploctenus maculipes* Strand, 1910	f) *E. fallax* Mello-Leitão, 1922
	g) *E. strandi* " " 1936
	h) *E. rondoni* " " 1922
4. *Enoploctenus morbidus* Mello-Leitão, 1939.	

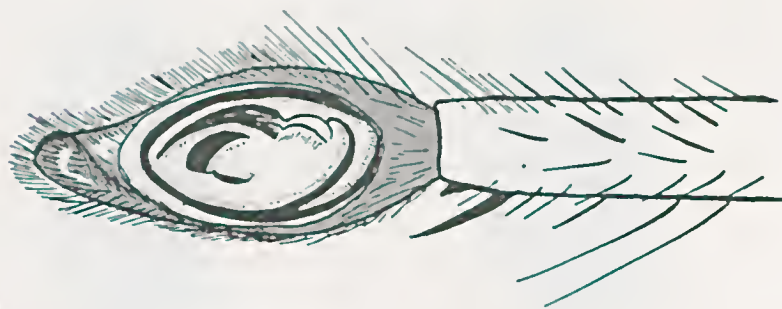
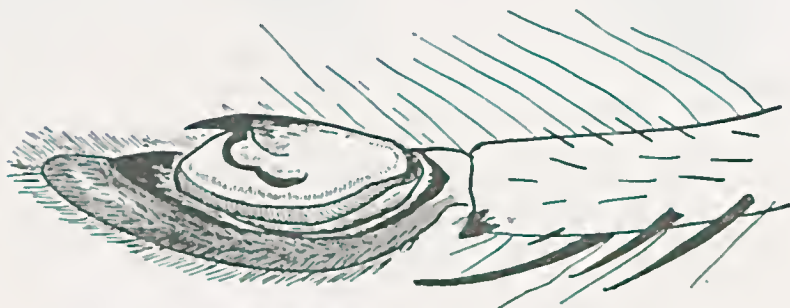
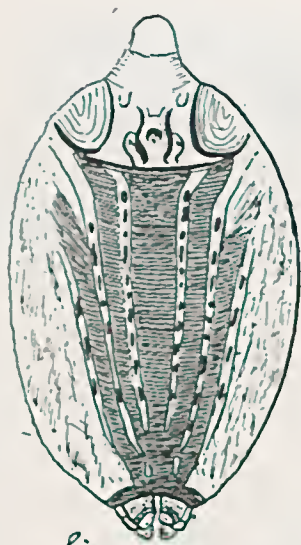
Agradecimentos ao sr. Rubens Nathan, tecnico de laboratório, que muito nos ajudou nas mesurações dos individuos da coleção do Instituto Butantan. Agradecemos, igualmente, ao sr. Laureano Dourado pela confecçãço das pranchas coloridas e muitos desenhos. Ao sr. Seixas ficamos gratos pelas fotografias. À distinta familia Urban devemos agradecimentos pelo esforço incansável na captura de Enoploctenidios, o que nos possibilitou este trabalho.

Vista anterior dos olhos de *Enoploctenus*. Os 4 olhos medianos formam um quadrilátero quase perfeito

Vista lateral do cefalotorax de *Enoploctenus*, com a posição dos olhos; vista lateralmente

Posição dos olhos de *Enoploctenus*, vista de cima

Quelicera de *Enoploctenus*, com os dentes nas duas margens

Perfil torácico de *Enoploctenus*

Perfil torácico de *Phoneutria*

Perfil torácico de *Ctenus*

Posição esquematizada dos olhos de *Enoploctenus*

Mem. Inst. Butantan,
23 : 1-44, Nov.° 1950.

Tibia e metatarso do segundo par de pernas de *Enoploctenus*

Enoploctenus cyclothorax — bulbo copulador do macho visto de frente (fig. 10); visto do lado esquerdo (fig. 11); visto do lado direito (fig. 12).

Figs. 13 - 17

Enoploctenus cyclothorax — Evolução dos desenhos e das estrias do ventre, segundo diferentes idades.

Figs. 18 - 22

Enoploctenus cyclothorax — Evolução e formação do epigino em diversas idades.

Foto 1
Enoploctenus maculipes Strand, 1910

Foto 2
Enoploctenus cyclothorax (Bertk. 1880) exemplar por longo tempo conservado em alcool e sem nuances de co-

Foto 3
Enoploctenus cyclothorax Vista dorsal

Foto 4
Enoploctenus cyclothorax — vista do lado inferior

Enoploctenus cyclothorax — vista ventral da fêmea

Enoploctenus cyclothorax — vista dorsal da femea

Enoploctenus cyclothorax — vista ventral do macho

Mem. Inst. Butantan,
23:45-50, Fev.° 1951.

ESTUDO DO SISTEMA EXCRETOR DE *LEPTOPHYLLUM STENOCOTYLE* COHN, 1902

(*Trematoda*: *Plagiorchiidae*)

POR JOSÉ M. RUIZ

(*Da Secção de Parasitologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil*)

Em 1942, publicamos uma nota, em colaboração com Aristoteris T. Leão, na qual fizemos algumas considerações sobre o gênero *Leptophyllum* Cohn, 1902 e sobre as espécies que se enquadravam no mesmo. Trabalhamos, na ocasião, com oito lotes de *Leptophyllum*, provenientes dos Estados de Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, todos tendo por localisação o intestino grosso de cinco espécies diferentes de ofideos. Pela comparação dos caracteres morfológicos verificaveis nas descrições e desenhos dos autores, constatamos serem idênticos, dentro de pequenas variações, sempre possíveis numa mesma espécie observada em condições diversas e por diferentes autores. Concluimos que "em vista de tais variações será difícil separar as espécies *L. travtrema*, *L. tamiamiensis* e *L. ovalis* da espécie tipo *L. stenocotyle* avaliando as condições em que trabalhou Cohn".

Reiniciando as atividades na Secção de Parasitologia do Instituto Butantan, tivemos ocasião de necropsiar três cobras provenientes de Mato Grosso parasitadas por *Leptophyllum*:

Dryadophis bifossatus trisscriatus, proveniente de Taunay, necropsia n.° 3.843, *Listrophis* sp., da mesma proveniência, n.° 3.851 e *Liophis* sp., proveniente de Carandazal, necropsia n.° 3.858. (cobras depositadas na coleção de ofiologia do Instituto). Desta forma temos ampliado a distribuição geográfica e os hospedeiros definitivos da espécie que identificamos a *L. stenocotyle*.

Uma parte dos especimes foi comprimida e outra foi fixada sem compressão. Fizemos um estudo cuidadoso de material vivo, comparamos o material comprimido com os lotes da coleção e dedicamos especial atenção aos exemplares não comprimidos, condição em que trabalhou Cohn, em 1902. Verificamos que a figura desse autor é bem correta, de acordo com as condições

Entregue para publicação em 2-2-51.

do material. Não temos dúvida que *Travtrema travtrema* Pereira, 1929 ou *Leptophyllum travtrema* (P) Ruiz & Leão, 1942 seja um estrito sinônimo de *Leptophyllum stenocotyle* Cohn, 1902. Quanto ás espécies exóticas permanecemos no mesmo ponto de vista anterior, com exceção da espécie *L. tamiamiensis* McIntosh, 1939 pois que o estudo do sistema excretor de *L. Stenocotyle*, que apresentamos nesta nota, permite a diferenciação específica.

Sistema excretor de L. stenocotyle.

Poro excretor terminal, subdorsal, guarnecido de um esfinter muscular pouco desenvolvido. Vesícula excretora tubular, lisa, ligeiramente recurvada em *S* ou quase reta, iniciando-se na zona testicular. Canais coletores primários (C^1) partindo da extremidade anterior ou inicial da vesícula, como acontece nos gêneros *Mesocoelium, Brachycoelium, Clypthelmins, Choledocystus, Paurophyllum,* etc. Esses canais são delgados, de calibre mais ou menos homogêneo e se dirigem para a frente, terminando acima da zona acetabular. Os canais coletores anteriores (C^2a) são um pouco mais curtos que os posteriores (C^2p). Os canais terciarios anteriores ($1C^3a$, $2C^3a$, $3C^3a$) têm origem comum num ponto situado ligeiramente abaixo da zona farigeana. Destes, $1C^3a$ se dirige diretamente para a frente e seus três capilares se distribuem pelas zonas da ventosa oral e da faringe.

$2C^3a$ é um tubo tortuoso e um tanto enovelado na propria zona de origem, apresentando um aspecto semelhante ao que se observa em *Paurophyllum simplexus* Byrd, Parker & Reiber, 1940. — Neste ponto a espécie brasileira difere de *L. tamiamiensis.* $3C^3a$ é dirigido diretamente para trás e se ramifica em seus três capilares um pouco acima da zona acetabular.

Os canais terciarios posteriores ($1C^3p$, $2C^3p$ e $3C^3p$) tem origem ao nivel da zona testicular. $1C^3p$ se origina um pouco á frente dos demais, como ocorre tambem em *Paurophyllum simplexus*, e, neste ponto, ainda difere no aspecto de *L. tamiamiensis.*

Todos os canais terciarios dão origem a um conjunto de três capilares sendo a formula do sistema 2 $(3+3+3)+(3+3+3)$. Os pormenores estão representados nas figuras anexas.

RESUMO

Da presente observação podemos tirar as seguintes conclusões:

1. *L. stenocotyle* é espécie distinta de *L. tamiamiensis.*
2. *L. travtrema* é sinonimo de *L. stenocotyle.*
3. O sistema excretor no gênero *Leptophyllum* é idêntico ao do gênero *Paurophyllum.*

SUMMARY

In this paper the excretory system of *Leptophyllum stenocotyle* Cohn, 1902 is described. *L. travtrema* is synonim of *L. stenocotyle* and *L. tamiamiensis* is a good species based on the extructure of the excretory system. The excretory system of the genus *Leptophyllum* is identical of those from *Paurophyllum*.

BIBLIOGRAFIA

1. *Byrd, E. E., Parker, M. V. & Reiber, R. J.*, 1940. — A new genus and two new species of digenetic trematodes, with a discussion on the systematics of these and certain related forms. Jl. Parasitol., **26**(2): 111-122.

2. *Byrd, E. E. & Roudabush, R. L.*, 1939 — *Leptophyllum ovalis* n. sp., a trematode from the "brown watersnake". Jl. Parasitol., **25**(6): 471-473.

3. *Cohn, L.*, 1902 — Zwei neue Distomen. Centr. Bakt. I Abt. Orig., **32**: 877-882.

4. *Pereira, C.*, 1929 — *Travtrema travtrema* n. gen. e n. sp., Trematoide parasito do intestino de cobra. Boletim Biologico **16**: 92-96.

5. *Ruiz, J. M. & Leão, A. T.*, 1942. — Algumas considerações em tôrno do gênero *Leptophyllum* Cohn, 1902 (*Trematoda*: *Plagiorchiidae*). Mem. Inst. Butantan, **16**: 187-195.

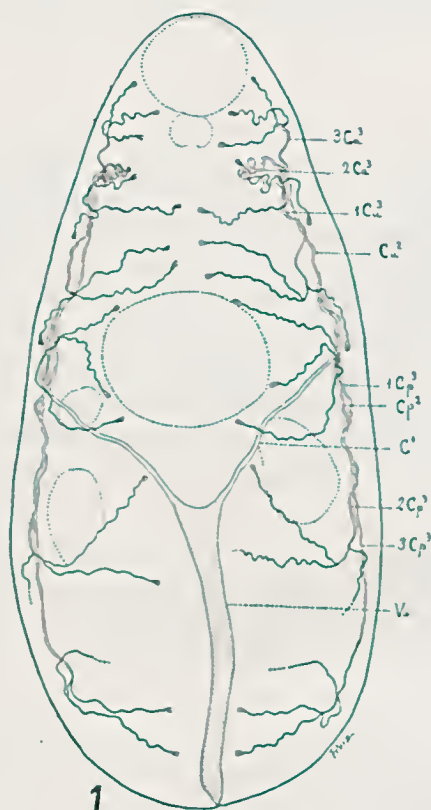



Fig. N.º 1

Pormenor do sistema excretor de *Leptophyllum stenocotyle*. Desenho à mão livre sem escala.

Fig. N.º 2

Sistema excretor de *Leptophyllum stenocotyle*. Pormenor do conjunto de canais terciarios anteriores, em particular de $2C_3a$.

ESTUDOS QUÍMICOS SOBRE OS VENENOS OFÍDICOS (*)

6. *Composição da Crotoxina* (**)

POR K. SLOTTA & J. PRIMOSIGH

Em 1938, isolou-se a substancia neurotóxica e hemolítica do veneno crotálico com uma proteina uniforme (1), contendo 13,2% de cistina e 1,36% de metionina (2). O peso molecular desta proteina, determinado na ultracentrifuga foi de 30.000 (sedimentação e difusão) ou 30.500 (equilibrio de sedimentação) (3). Pelo ensaio electroforético da crotoxina foi possivel comprovar a uniformidade desta proteina cristalizada (4). Experiencias de inativação da crotoxina com reagentes específicos para certos grupos mostram a grande sensibilidade da molécula (5).

Neste trabalho procura-se determinar quais os amino-ácidos que compõem esta proteína. Para isto usamos a cromatografia em papel (6) metodo mais indicado, porque torna possivel uma análise completa com quantidades mínimas de substância.

Acerto das técnicas — Preliminarmente fizemos experiências com *misturas de amino-ácidos puros* e depois com hidrolisados de *insulina* cristalisada, cuja composição é bem conhecida. Estas experiências preliminares eram necessárias, pois que os valores de R_f (isto é, a relação entre a distância percorrida pelo amino-ácido e a distância percorrida no papel pelo solvente) não são constantes, mas variam conforme a concentração dos amino-ácidos, número dos componentes (6), pH do hidrolisado em experiência (9), (13), e saturação da atmosfera da câmara cromatográfica (13); este último ponto é especialmente importante em experiência com fenol, onde influi muito a quantidade de amoníaco usado para a neutralização dos amino-ácidos.

Estudando misturas cada vez mais complexas de amino-ácidos puros podemos observar, confirmando assim a eficiência da nossa técnica, que com 2 cromatogramas mono-dimensionais, um com butanol-ácido acético e outro com fe-

Entregue para publicação em 14-4-51.

(*) Os primeiros cinco trabalhos foram publicados nas Memórias do Instituto Butantan 11:109, 121, 133, 1937; 12:505, 573, 1938.

(**) O presente trabalho foi realizado no Departamento Científico da Ind. Farm. Endochímica S/A.

nol + água, todos amino-ácidos comuns na natureza podem ser identificados, com exceção de valina + metionina e leucina + isoleucina que com estes solventes não podem ser separados.

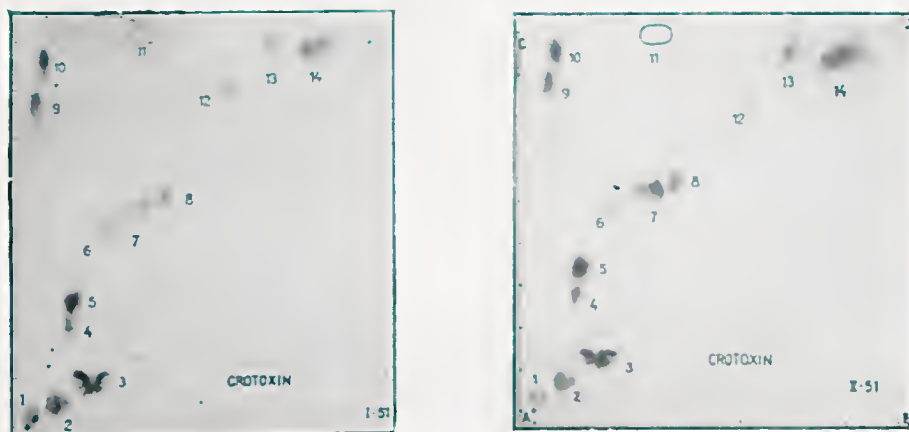
Por exemplo: o cromatograma mono-dimensional com *butanol + ácido acético* (fato que pode ser observado na fotografia n.º 2), — que para melhor separação dos amino-ácidos básicos deixamos percorrer 40 horas, — tornou possível a identificação dos seguintes amino-ácidos: cistina, lisina, histidina, arginina, alanina, prolina, tirosina, valina + metionina, fenilanina e leucina + isoleucina. Nêste cromatograma, contudo, o ácido aspártico, a glicina e a serina formam uma mancha única (ns. 2, 4 e 5 da fig. 2), o mesmo acontecendo com o ácido glutâmico e treonina (ns. 3 e 6 da fig. 2).

Com fenol + água podem ser separados os amino-ácidos que no cromatograma anterior ficam agrupados, isto é, o ácido aspártico, a glicina e a serina de um lado, e o ácido glutânico e a treonina do outro. A cromatografia em fenol + água permite a identificação da oxiprolina que aparece separada entre alanina e tirosina com um R_f = 0,50 e pode ser identificada usando a isatina numa reação específica recentemente publicada (14).

Para a separação dos conjuntos valina + metionina, e leucina-isoleucina precisa-se de dois outros cromatogramas mono-dimensionais. A *separação* da mistura *valina-metionina* é possível com colidina; assim aparece a valina, com um R_f = 0,55, separada de todos os outros amino-ácidos. Com este método, todavia, a metionina junta-se com a mancha fenilamina + leucinas e não pode ser identificada. Esta separação pode ser conseguida cromatografando prèviamente quantidade maior de hidrolisado com a mistura butanol + ácido acético numa zona com largura de alguns centímetros. Marca-se a área que contém a valina + metionina, corta-se, elui-se com água distilada e, após concentração do eluido, faz-se a cromatografia com colidina ou com butanol sec. + metil-etil-cetona (12). Este problema foi simplificado pelo trabalho recentemente publicado de Mc Farren (13), que usa m-cresol em solução aquosa tamponada em pH 8,4 e o papel prèviamente tratado com solução tampão do mesmo pH. Com este método é possível separar a valina e a metionina entre si e de todos os outros amino-ácidos.

Com álcool butílico sec. + metil-etil-cetona as *leucinas* podem ser bem separadas em tempo relativamente curto (6 horas, cromatografia ascendente) se estiverem isoladas dos demais amino-ácidos, isto é, depois de uma pré-separação dos amino-ácidos do hidrolisado com butanol + ácido e eluição da zona correspondente. Esta separação pode ser fàcilmente conseguida usando n-butanol + alcool benzílico em solução tamponada em pH 8,4, leucina e isoleucina aparecem bem separadas entre si e dos demais amino-ácidos, se cromatografarmos durante 40 horas (13.

Depois destes estudos preliminares com misturas artificiais de amino-ácidos puros, fizemos cromatogramas mono e bi-dimensionais de hidrolisados de *insulina* e identificamos todos os amino-ácidos desta proteina muito bem estudada.

Resultados — Após esta fase experimental preparamos crotoxina amorfa, coagulando pelo calor as proteinas inertes, e crotoxina cristalizada e recristalizada. Hidrolisamos a crotoxina recristalizada com ácido cloridrico sob pressão, removemos com a técnica usual o ácido e usamos este hidrolisado primeiramente para cromatogramas mono-dimensionais em butanol + ácido acético (fig. 2) e fenol + água. Assim foi possivel identificar inicialmente os seguintes amino-ácidos: cistina, lisina, histidina, arginina, ácido glutâmico, glicina, serina, ácido aspártico, treonina, alanina, prolina, tirosina, fenilanina e leucinas. Combinando-se estes dois cromatogramas mono-dimensionais em um bi-dimensional, usando as duas misturas de solventes na ordem butanol + ácido acético e fenol + água, foi possivel distinguir (figuras 1-a e 1-b) os mesmos amino-ácidos

Figs. 1-a e 1-b

Cromatogramas bi-dimensionais de um hidrolisado de crotoxina feito em papel Whatman N.º 1 usando como solventes a mistura butanol + acido acético na direção horizontal e fenol + água na direção vertical. O ponto marcado (+) indica o local onde foi posto o hidrolisado que na figura 1.ª correspondia a 300 microgramas, e na 1b, 250 microgramas de crotoxina. As manchas foram reveladas com ninidrina.

Identificação das manchas 1 = Cistina, 2 = Acido aspártico, 3 = Acido glutâmico, 4 = Serina, 5 = Glicina, 6 = Treonina, 7 = Alanina, 8 = Tirosina, 9 = Lisina, 10 = Argina, 11 = Prolina (mancha amarela que não aparece na fotografia, feita com filtro alaranjado), 12 = Valina + Metionina, 13 = Fenilalanina, 14 = Leucina + Isoleucina.

anteriormente mencionados com exceção de histidina que devido a sua concentração mínima não pode ser nitidamente observada, quer no cromatograma mono-dimensional com papel Whatman n.º 1, quer no cromatograma bi-dimensional.

Para eliminar a dúvida a respeito da presença ou ausência da histidina, fizemos uma série de experiências no sentido de poder usar maior quantidade de hidrolisado. Verificamos que com a mistura butanol + ácido acético, o papel Whatman n.º 3 permite trabalhar dupla é até quádrupla da usada com papel Whatman n.º 1.

O resultado pode ser observado na fig. 2, que é constituida de dois cromatogramas desenvolvidos simultâneamente, o cromatograma *A*, tendo sido revelado pela ninidrina e o *B*, pelo reagente de Pauly (ácido sulfanilico diazotado)

Fig. 2

Cromatogramas mono-dimensionais de um hidrolisado de crotoxina, feito em papel Whatman N.º 3 com butanol-ácido acético. Nos pontos com a marca (+) foi posto hidrolisado corresponde a 200 microgramas. O cromatograma *A* foi revelado com niidrina enquanto que *B* foi revelado com carbonato de sódio e ácido sulfanilico diazotado. O ultimo mostra a mancha nitida das histidina corresponde à marca *a* no cromatograma *A*. Os outros numeros têm a mesma significação que nas figs. 1ª e *Ib*. Notar que a tirosina (ponto n.º 8 cromatograma A) também foi conjugada com o ácido sulfanilico diazotado (no cromatograma *B*).

Vêm-se no cromatograma B bem nitidas as manchas de histidina e tirosina, as únicas que reagiram com o reagente de Pauly, em frente às manchas marcadas *a* e 8 respectivamente do cromatograma *A*.

Dois outros problemas podiamos resolver ao mesmo tempo usando o método de Mc Farren já mencionado (13) (*): a separação da *valina e metionina*.

(*) Antes do trabalho de Mc Farren (13) fizemos experiências com colidina para provar a presença da *valina* que no nosso cromatograma bi-dimensional (fig. 1) aparece junto com a metionina. Tendo sido a metionina já identificada como componente da crotoxina e determinada quantitativamente (2) não nos interessou fazer nova prova da existência deste amino-ácido no hidrolisado da crotoxina. No cromatograma com colidina aparece uma mancha que agrupa metionina, fenilalanina, e as leucinas. Em experiências com misturas artificiais de amino-ácidos e com hidrolisados de crotoxina conseguimos com colidina + água, separar a valina dos demais amino-ácidos.

Com dois métodos diferentes foi-nos possivel provar a presença deste amino-ácido: 1.º por meio da determinação do fator R_f, que é 0,55 (cromatografia ascendente) confirmado cromatografando-se simultâneamente sob as mesmas condições 5 microgramas de valina;

de um lado e *leucina e isoleucina* de outro. Usando m-cresol com solução tampão de borato, pH 8.4, e papel Whatman n.º 1 prèviamente tratado com o mesmo tampão, obtimos bôa separação de valina e metionina depois de cromatografar durante 40 horas (fig. 3).

Fig. 3

Cromatogramas mono-dimensionais feitos em papel Whatman N.º 1 tamponado em pH 8,4 usando como solvente N-butanol + álcool benzílico. *A* é de 20 microgramas de uma mistura em partes iguais de valina e metionina, enquanto que *B* é de 100 microgramas de crotoxina. 12 *a* = Valina, 12 *b* = Metionina.

Fig. 4

Cromatogramas mono-dimensionais feitos em papel Whatman N.º 1 tamponado em pH 8,4, com m-cresol tamponado em pH 8,4. O cromatograma em pH 8,4. O cromatograma *A* é de 20 microgramas de uma mistura em partes iguais de leucina e isoleucina, enquanto que o *B* é de 100 microgramas de crotoxina. 14b = Isoleucina, 14 a = Leucina, 13 = Fenilalanina.

Tamponando da mesma maneira o papel e a mistura, mas usando n-butanol + álcool benzílico, foi possivel separar leucina da isoleucina, apesar desta separação não ser tão nítida como a de valina e metionina (fig. 4).

Para confirmar a ausência de oxiprolina, amino-ácido pouco frequente na composição de proteínas (15), usamos cromatogramas com fenol + água e m-cresol + água. Os cromatogramas com fenol não mostraram, mesmo com hidrolisado de 300 microgramas de crotoxina, nenhum indicio de coloração com ninidrina. Também cromatogramas de hidrolisados de 100 e 200 microgramas de crotoxina respectivamente com m-cresol + água e papel tamponado, deram resultados negativos.

Admitindo-se que cada molécula da crotoxina contenha uma molécula de oxiprolina esta estaria presente na concentração de 0,4%. Com papel Whatman n.º 3, usando o hidrolisado de 1 miligrama de crotoxina, que deveria pois conter no mínimo 4 microgramas de oxiprolina, não foi possivel verificar uma mancha

---

2.º misturando 5 microgramas de valina pura com hidrolisado de 100 microgramas de crotoxina, o cromatograma mostra uma mancha mais intensa no lugar devido.

Para separar a leucina da isoleucina utilizamos detalhes técnicos publicados recentemente (12): eluimos a zona contendo as leucinas de um cromatograma de hidrolisado de crotoxina feito em butanol + ácido acético e com esta solução fizemos um cromatograma ascendente durante 6 horas com uma mistura de butanol-sec. + metil-etil-cetona.

correspondente à oxiprolina nem com ninidrina, nem com isatina em cromatogramas com m-cresol + água e papel tamponado. Experiências comparativas indicaram que com 4 microgramas de oxiprolina se obtém com isatina manchas azues bem visíveis.

Não hidrolisamos crotoxina com álcali para verificar a presença de triptofana anteriormente encontrada (15) e até determinada quantitativamente (5).

Reunindo estes resultados podemos concluir que a molécula de crotoxina é constituida dos 18 amino-ácidos seguintes, classificados segundo um sistema sugerido recentemente (17):

Com cadeias laterais catiônicas: arginina, histidina e lisina.

Com cadeias laterais aniônicas: ácidos aspártico e glutâmico.

Com cadeias laterais não polares: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina.

Com cadeias laterais polares não-iônicas: serina, treonina, tirosina, triptofana, metionina, cristina.

Durante a execução deste trabalho, Hasson e Gonçalves (16) publicaram resultados da análise cromatográfica de um componente tóxico separado do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* por eletroforese. Os referidos autores identificaram os mesmos amino-ácidos por nós descritos, com excepção da valina, argina e histidina.

PARTE EXPERIMENTAL

Material e Técnicas

1.º) *Crotoxina.* A crotoxina foi preparada seguindo-se a técnica anteriormente descrita por Slotta e Fraenkel-Conrat (1). O melhor rendimento foi obtido partindo de veneno recentemente colhido oferecido gentilmente pelo Instituto Pinheiros. As proteinas inertes eram coaguladas pela ação do calor em pH ácido, a crotoxina era precipitada por neutralização com amônea e cristalizada em presença duma mistura de piridina e ácido acético em pH 4,1. Finalmente era recristalizada e dessecada em alto vácuo.

2.º *Hidrólise.* 10 miligramas de crotoxina eram dissolvidas à temperatura ambiente em 10 ml de ácido cloridrico 6 N, livre de metais pesados. Este era preparado de ácido clorídrico redistilado cinco vezes. A solução ácida de crotoxina era hidrolisada num tubo de vidro fechado, por aquecimento a 120.ºC durante 18 horas. Do hidrolisado levemente amarelo, o excesso de ácido clorídrico era retirado por liofilização, redissolução do residuo e nova liofilização. Este processo era repetido 3 a 4 vezes. O resíduo final, dissolvido em 1 ml de água morna, era filtrado. 0,01 ml do hidrolisado obtido continha, portanto, os amino-ácidos correspondentes a 100 microgramas de crotoxina; em algumas

experiências tornou-se vantajoso aumentar a concentração para 200 microgramas por 0,01 ml. Desta solução mais concentrada eram utilizados 0,005 ml para cada cromatograma mono-dimensional.

3.º) *Papel.* Em geral usávamos o papel Whatman n.º 1 em tiras de 5x57 cm para cromatogramas mono-dimensionais e em folhas de 57x57 cm para cromatogramas bi-dimensionais. Para a determinação de histidina usávamos papel Whatman n. 3 devido a sua maior capacidade.

4.º) *Câmaras e cilindros para cromatografia.* Os cromatogramas mono-dimensionais eram executados em manilhas com 15 cm de diâmetro interno e 75 cm de altura, com a parte inferior (menor) fechada com cimento e a superior com bordos esmerilhados e engraxados para assegurar o contato perfeito e fechamento hermético com uma placa de vidro. No fundo do cilindro era colocada uma placa de Petri contendo o solvente apropriado. A saturação do ambiete demorava cerca de meia hora. Como reservatório do solvente usamos as barquinhas descritas por Consden e colabs. (6) com 25 cm de comprimento e cerca de 30 ml de capacidade.

Para os cromatogramas bi-dimensionais usávamos caixas de madeira de 20x70x70 cm tendo a frente fechada por vidro, para permitir a observação do andamento do processo. A introdução da barquinha de 200 ml de capacidade era feita pelas abertura superior que media 65 cm de comprimento. No fundo da câmara cromatográfica punhamos 4 placas de Petri cheias com o solvente, 2 horas antes de iniciar a cromatografia.

5.º) *Reagentes.* .

a) Mistura *N-Butanol + Acido acético* —

Composta de 40 partes de n-butanol, 10 de ácido acético glacial e 50 de água em volume. A camada superior, rica em butanol, era usada na barquinha para a cromatografia e a inferior, constituida de água saturada com o solvente, era usada nas placas de Petri para saturar o ambiente. Os reagentes usados eram "para análise" e utilizados sem purificação ulterior.

b) Mistura *Fenol + água* —

Preparada com 80 partes de fenol redestilado e 20 de água destilada.

c) *M-Cresol* —

M-Cresol técnico destilado uma vez sob pressão atmosférica e saturado com tampão de borato de pH 8,4 em funil de separação (13).

d) Mistura *Colidina + Água* —

A) colidina (recebida de Schweizerische Teerindustrie AG. Pratteln, Baseland) não foi purificada e a mistura era feita saturando-se esse reagente com água por meio de um funil de separação.

e) Mistura *N-Butanol + Álcool benzílico* —

Preparada conforme Mc Farren (13).

f) *Reagente de Pauly* —

Consiste de duas soluções separadas:

Sol. 1) 5g de nitrito de sódio em 1 000 ml de água destilada

Sol. 2) 5g de ácido sufanílico em 50 ml de ácido clorídrico concentrado completando-se com água destilada o volume de 1000 ml.

No momento de usar, misturava-se um ml da solução 1) com 50 ml da solução 2).

g) *Ninidrina* —

Foi usado o produto "para análise", sem mais purificação, na percentagem de 0,2 em n-Butanol prèviamente saturado com água.

h) *Isatina* —

Foi usado um preparado com ponto de fusão 201.° C, na concentração de 0,2% em n-butanol contendo 4% de ácido acético.

6.°) *Colocação do hidrolisado.* Geralmente para cromatogramas nonodimensionais eram colocadas quantidades de hidrolisado correspondentes a 100 e 150 microgramas da proteína contidas em 0,005 ml a 0,01 ml por meio de uma micropipeta graduada ao 0.001 ml. O material era colocado à distância de 8.5 ml da margem superior da tira de papel e dessecado em corrente de ar quente proveniente de um secador elétrico. Para as experiências com papel Whatman n.° 3 usávamos quantidades de hidrolisado entre 200 e 300 microgramas contidos em 0.01 a 0,02 ml.

Nos cromatogramas bi-dimensionais, que sem exceção foram feitos com papel Whatman n.° 1, o lugar da colocação do hidrolisado era a 9,5 cm das margens superior e lateral. O Cromatograma da figura 1b, foi feito com uma quantidade de amino-ácido correspondente a 350 microgramas de crotoxina num volume de 0,02 ml. Os cromatogramas comparativos continham num mesmo volume a mesma quantidade de uma mistura artificial de amino-ácidos. Depois da secagem, o papel era colocado na câmara, já saturada pelo solvente. Na combinação n-butanol + ácido acético e fenol — água achamos preferível esta sequência, isto é, n-butanol + ácido acético para a primeira dimensão e fenol + água para a segunda. Recomenda-se também, na cromatografia com n-butanol + ácido acético, deixar continuar a cromatografia até o solvente gotejar

do bordo do papel. o que leva mais ou menos 40 horas. Deste modo, aumentam-se as distâncias entre os amino-ácidos separáveis com este solvente, obtendo-se melhores resultados na separação seguinte com fenol + água.

Depois de feita a cromatografia na primeira dimensão tira-se da câmara cromatográfica o papel úmido, juntamente com a barquinha. Restos do solvente retidos na barquinha eram removidos por aspiração e o papel era a seguir dessecado em corrente de ar quente. A folha de papel era então, colocada novamente na barquinha. porém com um giro de 90.º e a barquinha cheia, agora, com a mistura fenol + água. Para a neutralização dos amino-ácidos, colocamos na câmara o conteúdo de 5ml de amônea a 25% (D = 0.910) numa placa de Petri para manter o ambiente saturado de amoniaco. Nem cianeto nem monóxido de carbono foram usados.

A cromatografia era interrompida quando faltavam 2 cm para o solvente atingir a margem inferior da folha de papel. Neste momento, tirávamos o papel da câmara. secávamo-lo primeiramente numa corrente de ar quente e depois 10 minutos numa estufa entre 80 a 90.º C, apesar do perigo de destruição parcial de alguns amino-ácidos (10 e 11). Secávamos a estas temperaturas para remover os últimos restos de amoniaco, que prejudicam o cromatograma, produzindo com ninidrina, zonas azues difusas que dificultam a verificação da existência de alguns amino-ácidos. A folha de papel sêca era umidecida uniformemente com solução de ninidrina a 0.2% usando para isso um nebulizador. Logo após séca-se toda a folha numa corrente de ar quente até que as manchas azues comecem a aparecer. Em seguida com uma lâmpada de raios infra-vermelhos reforçamos as manchas individuais até atingir a sua máxima intensidade.

7.º) *Métodos especiais.*

a) Determinação de *histidina e tirosina* —

Em tiras de papel Whatman n.º 3 de 12x50 cm, eram colocadas duas amostras de hidrolisado (200 microgramas / 0,02 ml) e cromatografadas com a mistura n-butanol + ácido acético durante 40 horas. Depois de proteger uma parte da tira de papel interpondo-a entre duas placas de vidro, o cromatograma *B* era saturado com uma solução aquosa de 2,5% de carbonato de sódio e secado à temperatura ambiente. Depois era adicionada sobre esta parte uma solução de ácido sulfanílico diazotado por meio de um nebulizador. As duas manchas côr de tijolo da histidina e tirosina apareciam depois de poucos segundos no fundo ligeiramente amarelado e ficavam estáveis durante alguns dias. O cromatograma *A* era revelado com ninidrina.

b) Determinação de *valina* —

1) *Com m-Cresol.* Papel Whatman n.º 1 era saturado com solução tampão de borato de pH 8.4 conforme Mc Farren (13) e sêco á temperatura ambiente.

O m-cresol era saturado no funil de separação com esta mesma solução tampão. Simultâneamente eram cromatografados durante 40 horas um hidrolisado correspondente a 100 microgramas de crotoxina (*B*) e uma mistura de valina e metionina (10 microgramas de cada) (*A*).

2) Com *colidina + água*. Os cromatogramas ascendentes de um hidrolisado de crotoxina apresentaram uma mancha azul totalmente isolada na mesma altura que nos cromatogramas feitos nas mesmas condições com valina pura. Para confirmar este achado, 5 microgramas de valina pura foram adicionados a uma nova porção do hidrolisado de 100 microgramas de crotoxina e novo cromatograma foi feito. No lugar característico da valina apareceu uma mancha mais intensa.

c) Determinação da *leucina e isoleucina* (veja fig. 4).

Usávamos papel Whatman n.° 1 tratado com tampão de borato pH 8,4 (13). A mistura de n-butanol-ácool benzílico era saturada com o mesmo tampão. Depois de cromatografar 40 horas, a existência destes dois amino-ácidos nitidamente separados (*B*) era provada e confirmada pelo cromatograma simultâneo de uma mistura de leucina e isoleucina (10 microgramas de cada) (*A*).

RESUMO

Por meio da cromatografia de partição bi-dimensional em papel foi demonstrado que a crotoxina contém pelo menos 14 amino-ácidos. Além destes, por meio de técnicas especiais de cromatografia mono-dimensional, foi possível demonstrar que a crotoxina contém valina, histidina, leucina e isoleucina, e não contém oxiprolina.

Pode-se afirmar, que a crotoxina cristalina é composta dos seguintes 18 amino-ácidos: arginina, histidina, lisina, ácidos aspártico e glutâmico, fenilalanina, triptofana, tirosina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, cistina, metionina.

ABSTRACT

The presence of at least 14 amino-acids in the acidic hydrolizate of crystalline crotoxin has been demonstrated by two — dimensional partition chromatography on paper. Also it has been possible to prove by one-dimensional chromatography, using special techniques, that crotoxin contains valine, histidine, leucine and isoleucine, whereas hydroxyproline is absent.

It can now be asserted that crystalline crotoxin is composed of the following 18 amino-acids: arginine, histidine, lysine, aspartic and glutamic acids, phenylala-

nine, trytophan, tyrosine, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, serine, threonine, cystine, methionine.

Agradecemos à Diretoria do Instituto Pinheiros e particularmente ao DD. Diretor Dr. Anibal A. Pereira, pela magnânima ajuda presiada e espírito de cooperação científica.

As fotografias foram executadas por J. Jaeger; H. Benedick prestou serviços técnicos valiosos; a estes nossos agradecimentos.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, K. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — Mem. Inst. Butantan **12**: 505, 1938.
2. *Slotta, K. & Forster, W.* — Mem. Inst. Butantan **12**: 513, 1938.
3. *Gralén, N. & Svedberg, T.* — Biochem. J. **32**: 1375, 1938.
4. *Li, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — J. Amer. Chem. Soc. **64**: 1586, 1942.
5. *Fraenkel-Conrat, H. L. & Fraenkel-Conrat, J.* — Biochim. Biophys. Acta **5**: 98, 1950.
6. *Consden, R.; Gordon, A. H. & Martin, A. J. P.* — Biochem. J. **38**: 224, 1944.
7. *Dent, C. E.* — Biochem. J. **43**: 169, 1948.
8. *Ishii, S. & Ando, T.* — Repts. Radiation Chem. Research Inst., Tokyo Univ. **5**: 53, 1950; cit. por Chem. Abstr. **44**: 9503 g, 1950.
9. *Landua, A. J.; Fuerst, R. & Awapara, J.* — Anal. Chem. **23**: 162, 1950.
10. *Fowden, L. & Penney, J. R.* — Nature **165**: 846, 1950.
11. *Brush, M. K.; Boutwell, R. K.; Barton, A. D. & Heidelberger, C.* — Science **113**: 4, 1951.
12. *Boissonas, R. A.* — Helvet. Chim. Acta **33**: 1966, 1950.
13. *Mc Farren, E. F.* — Anal. Chem. **23**: 168, 1951.
14. *Acher, R.; Fromageot, C. & Jutisz, M.* — Biochim. Biophys. Acta **5**: 80, 1950.
15. *Tristram, P. R.* — Advances in Protein Chemistry **5**: 83, 1949.
16. *Hasson, A. & Gonçalves, J. M.* — Ciência e Cultura **2**: 54, 1950.
17. *Haurowitz, F.* — Chemistry and Biology of Proteins: Academic Press Inc., New York: **31**: 1950.

ENVENENAMENTO BOTRÓPICO E CROTÁLICO

Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões

POR M. DE FREITAS AMORIM; R. FRANCO DE MELLO & F. SALIBA

(Secção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

A anatomia patológica do envenenamento ofídico foi, até hoje, pouco estudada, tanto no homem, como nos animais. Apesar dos estudos experimentais terem começado já, em 1860, com os trabalhos de Mitchell, este autor só prosseguiu em suas pesquisas em 1868 e, depois, após uma outra interrupção, em 1886.

Além disso, somente tivemos em 1909, o trabalho de Pearce. Mais tarde, apareceu a publicação de Taube e Essex e, finalmente, a de Fidler, Glasgow e Carmichael.

Quanto à anatomia patológica das lesões do ofidismo no homem, raros trabalhos se conhecem na literatura, salientando-se, principalmente os de Rotter, em Costa Rica, que relata os seus achados em 3 autópsias. E entre nós, há a publicação de Mac Clure que estudou um caso de envenenamento botrópico.

Em vista da raridade dos trabalhos sobre esse assunto, julgamos util analisar as publicações consultadas, passando depois à descrição das principais lesões histológicas encontradas em nossas experiências.

HISTÓRICO

Mitchell iniciou as suas investigações em 1860, continuando-as em 1868, quando aplicado o veneno crotálico (provavelmente de *Crotalus adamanteus*) diretamente sobre o mesentério exposto, conclúi que a hemorragia é provocada pela ação direta do veneno sobre a parede vascular. Mais tarde (1886), Mitchell e Reichert demonstram que a hemorragia não ocorria, nas artérias e nas veias, mas só nos capilares. Como não encontrassem lesões ou rupturas da parede capilar, deduziram que o sangue escapava por filtração através da parede vascular.

Entregue para publicação em 17 de julho de 1951.

Wilson (1808) estudou 48 casos humanos fatais de envenenamento crotálico dos quais somente 4 com autópsia, assim mesmo incompleta. Nenhum desses casos possuia exame histológico.

Bates (1925-27) descreve 2 casos de autópsia de picados. Em 1926, Mallory faz o estudo histológico pormenorizado de um terceiro caso de autópsia, descrevendo "numerosos trombos hialinos nos capilares do pulmão" e também alguns, no figado. A intima da maioria dos vasos se achava fragmentada ou "missing". A adventícia e a média eram normais. Segundo Rotter (1937), os 3 casos de autópsia acima referidos devem ser de pessoas picadas, provavelmente por *Bothrops atrox* que é a serpente mais frequente, na America Central, onde aqueles autores fizeram as suas observações.

Entre nós, Mac-Clure (1935) publica um caso de picado por *Bathrops jararacussu*, relatando em detalhe as lesões encontradas na autópsia que consistiram, especialmente, em uma glomerulo-nefrite aguda difusa.

Azevedo e Teixeira (1938) descrevem um caso humano de autópsia em um picado por *Bothrops jararaca*, no qual encontram necroses simetricas do cortex renal, estudado principalmente essa lesão do rim em relação com a eclampsia.

Pearce (1909) em um importante estudo, hoje clássico, descreve em minúcia, as lesões glomerulares produzidas experimentalmente pelo veneno de *Crotalus adamanteus*. Pearce tendo usado antes esse veneno para o estudo experimental do edema, baseado na sua conhecida ação hemorrágica, notou a produção de uma lesão glomerular "exsudativa" que chamou a sua atenção. Por isso, resolve empreender em um trabalho posterior, o estudo mais detalhado dessa lesão. Até então, as lesões renais importantes, afectando só o glomerulo eram limitadas à cantaridina e ao arsénico. Pearce acrescenta a este grupo o "venom" pela sua ação endoteliotóxica, já antes demonstrada por Flexner e Noguchi (1902). Pearce empregou 21 coelhos, usando uma solução salina padrão de 0,85% que continha em 1 cm³, a quantidade de 0,5 mg de veneno seco. Por via intravenosa, uma única dose de 0,5 mg de veneno, era suficiente para provocar a morte de um coelho de 1500g de 5 a 6 dias depois. Comtudo, nesses animais, o autor não encontrava lesões glomerulares francas. Estas ocorriam quando a dose era dada em cada 2 ou 3 dias e, "quase constantemente, após uma única dose de 1 mg, ou com uma administração total de 2 mg em 4 doses. Com a grande dose única de 1 mg o animal usualmente desenvolve uma hematuria ou uma hemoglobinuria dentro de 24 horas", além da albuminuria de intensidade variável. Os animais eram sacrificados quando aparecia uma franca hematuria ou albuminuria.

Dos 21 coelhos, obteve lesões renais somente em 14, sendo 11 do 5.º ao 6.º dia e 3 com 1 a 4 dias após a injecção. Os 7 outros coelhos que não apresentavam lesões eram animais que receberam uma só dose ou varias pequenas doses

Ele divide as lesões glomerulares encontradas nos 14 coelhos em dois tipos, ambas de natureza essencialmente vascular.

O *primeiro tipo* consistia em uma *lesão hemorrágica*, óra na espessura do tufo glomerular (intra-glomerular), sem ruptura, óra dentro do espaço capsular, livre (intra-capsular). As hemacias podem estar aglutinadas em massas hialinas em que as células não são distintas, possivelmente devido ao efeito lizante do veneno sobre as células vermelhas. Pequenos acúmulos de fibrina ou de serum podem ser associados com a hemorragia, mas "os leucocitos são raramente encontrados".

Em alguns casos muitos glomerulos apresentavam a hemorragia; em outros somente, alguns, na proporção de 1 para 2 ou para 3, 4 e 5 e raramente, um glomerulo hemorragico para cada 12 a 20 não hemorragicos.

O *segundo tipo de lesão* era caracterizado por fenomenos que o autor classifica como exsudativos, isolados ou associados às hemorragias intra-glomerulares. O exsudato é constituido às vezes, por todos os elementos do sangue, principalmente hemacias, ou somente de sôro, ou de sôro e de fibrina, ou de raros leucocitos.

"Um aspecto comum diz Pearce é aquele de uma delicada rede de fibrina contendo hemacias e granulações de serum coagulado". Em um animal, encontrou em muitos glomerulos um exsudato densamente fibrinoso, homogéneo, fortemente corado pela eosina. Outras vêzes, os capilares do tufo são indistintos por causa das massas de fibrina hialina, dando a aparência de uma *degeneração fibrinoide* do tufo. Pearce, interpreta esses fenómenos como correspondendo a uma nefrite vascular, devida a uma lesão primária que afectou os capilares do glomerulo e analoga às produzidas em qualquer parte do corpo pelo veneno e que levaram à hemorragia. As lesões dos capilares eram caracterizadas por freqüênte tumefacção da parede com o aspecto granuloso e com núcleos picnóticos ou inchados, fracamente corados e "reduzidos em número". Outros mostram a erosão do tecido ou solução do mesmo, vendo-se no meio de u'a massa de exsudato, um tufo com núcleos, em sua porção central, porem, sem nenhum núcleo na periferia". Estas alterações são diferentes daquelas que ocorrem nas formas comuns de nefrite experimental, mostrando um *processo analogo ao da autólise* o qual póde ser explicado pela ação do princípio endoteliolitico". O autor conclui por uma ação selectiva do veneno sobre o endotélio glomerular documentada pela quase completa ausência de lesões no epitelio tubular. Na maioria dos animais, não existiam lesões tubulares. Somente em poucos, existia uma típica inchação turva e acidentalmente, uma evidente degeneração vacuolar. Nunca havia necrose ou destruição nuclear, e, "raramente, a degeneração gordurosa pelo sudan". Ele encontra cilindros de origem exsudativa com produtos de hemólise, porem, não de origem tubular. As células da cápsula de Bowman eram normais, ou, bem conservadas. Pearce, conclui que se trata de uma es-

quisita lesão exsudativa, caracterizando um tipo de nefrite vascular experimental, até aqui, não descrita, diferente da produzida pelo arsênico, cantaridina e por outros venenos.

Taube e Essex (1937) descrevem detalhadamente os seus achados em cães mortos de 8 minutos a 20 horas depois da injecção intravenosa de veneno de *Crotalus adamanteus* "Rattlesnake". Encontraram hemorragias petequiais e maciças em todas as serosas e mucosas e também, em vários parênquimas.

Rotter (1937), em Costa Rica, descreve em minúcia os seus achados histológicos em 3 autópsias de picados por *Bothrops atrox* ("terciopelo"). A dose letal do veneno é de 0,02 mg por quilo de coelho, sendo 3 vezes e ½ menor que a da *Bothrops* brasileira (provavelmente, *Bothrops jararaca*). A ação proteolitica do veneno tambem é menor que a da *Bothrops* brasileira.

Por isso o autor começa acentuando, em seu trabalho, "que essa mediocre propriedade proteolítica do veneno da *Bothrops* costariquense seria importante para a interpretação dos seus achados de autópsia, *de vez que as alterações histológicas poderiam ser modificadas por esse fato em relação aos achados de outros paises*". Segundo o autor, o veneno brasileiro produz a dissolução da gelatina em duas horas, na dose de 1 mg de veneno para 1 cm^3 de uma solução a 20% de gelatina, enquanto que o veneno costariquense só a produz depois de 22 horas.

No primeiro caso do autor, tratava-se de um homem de 50 anos, morto 78 horas após a picada no pé direito. Recebe duas injecções de sôro Butantan. Na autópsia, encontra: fócos de amolecimento vermelho do tamanho de uma noz nos hemisférios cerebelares; hemorragias extensas sub-piais na convexidade do cerebro e do cerebelo. Edema pulmonar, hiperemia do baço, fígado e rins.

No segundo caso, uma menina de treze anos, picada no braço direito, recebe duas injecções de sôro Butantan. Encontra intensa anemia. Hemorragia pela boca. Morte, 56 horas após a picada. Na autópsia: edema hemorrágico do braço direito e na musculatura do torax do mesmo lado. Tumefacção cerebral com o achatamento das circunvoluções. Edema pulmonar. Hiperemia dos orgãos parenquimatosos.

No terceiro caso, individuo de 25 anos, picado no pé esquerdo. 3 ampolas de sôro Butantan. Gangrena seca do pé e da perna esquerda. Paralisia direita dos membros. Taquicardia. Forte anemia generalizada. Morte, 86 dias após a picada. Na autópsia: trombose de ambas as veias femurais, ilíaca direita e veias renais esquerdas, esplénicas, veias piais da convexidade do cérebro. Extensas hemorragias nos bacinetes. Hemorragia antiga, pigmentada do tamanho de uma cereja, sub-cortical, na parte posterior do lobo parietal esquerdo. Numerosas embolias pulmonares pequenas. Intensa ancilostomíase.

Diz Rotter, que "se limita a descrever só as alterações do sistema nervoso central e do sistema vascular, porque nos órgãos restantes não se encontra

nenhuma lesão diretamente relacionada com a ação do veneno ofídico" ("da an den übrigen Organen keine direkt mit der Schlangen-giftwirkung in Beziehung zu setzenden Veraenderungen gefunden wurden"). Trata as alterações vasculares nas proximidades do ponto da picada separadamente das do sistema vascular cerebral, porque julga que póde relacionar as primeiras com a ação proteolítica.

I — Histologicamente Rotter descreve, *nas vizinhanças da picada*, forte edema e hemorragia. *Grandes artérias e veias* inalteradas morfologicamente. Endotélios conservados.

As *pequenas artérias* mostram alterações graves. A parede do vaso, total ou parcialmente transformada em uma massa homogénea, sem limites com a adventícia. Tem a impressão de que o plasma sanguíneo inundou a parede e as vizinhanças. Endotélios no território hialinizado, destruidos ou só em parte, conservados.

Pré-capilares: alterações idênticas, sendo a parede transformada em um anel espesso, homogéneo, sem luz reconhecível (homogeneização da parede dos pré-capilares). A lesão é só na média. Células endoteliais conservadas.

Veias: apresentam núcleos dispostos em paliçada. Diz o autor neste ponto, que a conservação dos endotélios, torna improvável o mecanismo das lesões por ação proteolítica do veneno (pg. 412). "Muito mais provavel é que tenhamos aqui, as conseqüências de uma perturbação funcional grave do sistema vascular no sentido de uma hiperemia peri-estática". ("sehr viel wahrscheinlicher ist es, dass wir die Folgezustaende einer schweren funktionellen Stoerung des Gefässystems im Sinne einer pariestatischen Hiperämie vor uns haben"). Por esse mecanismo falariam tambem as lesões cerebrais.

II — *Hemorragias do cerebelo*: o estudo histologico das hemorragias do cerebelo também mostra que são grandes fócos hemorrágicos por confluência de numerosas pequenas hemorragias anulares, peri-capilares, as quais se observam em massa na zona marginal do infarto vermelho.

As maiores artérias se apresentam também aqui morfologicamente, não alteradas, porém, as pequenas artérias apresentam a mesma homogeneização da parede. São freqüentemente envoltas por hemorragias e necrosadas, conforme ele demonstra em suas microfotografias 4, 5, 6 e 7 (Angionekrose).

Nos *gânglios da base*, as mesmas lesões arteriais, conquanto menos intensas.

No seu segundo caso, Rotter não encontrou infarto vermelho. Apenas forte edema ou tumefacção cerebral, principalmente nos gânglios da base.

Interpreta a ação do veneno botrópico como desencadeando uma perturbação funcional do sistema vascular cerebral, no sentido de uma hiperemia peri-estática. Tal conceito concordaria com a localização das lesões no cerebelo.

gânglios da base e nas meninges moles, as quais são tambem alteradas em outros envenenamentos, como no monoxido de carbono e na eclâmpsia, como sédes de predilecção.

Rotter interpreta as diferenças de intensidade nos seus casos 1 e 2 pela rapidez da reabsorção e pelas propriedades individuais do sistema vascular cerebral nos trópicos, pois encontrou alterações idênticas na *malária*, nos vasos cerebrais, com ruptura da barreira entre o sangue e os tecidos nervosos. A homogeneização da parede vascular, bem como o aparecimento de numerosos "Corpora amylacea" seria a expressão da penetração do plasma sanguineo. Tratar-se-ia da mesma alteração funcional que ocorre nos casos de malária grave cerebral com enorme dilatação e super-enchimento dos capilares, correspondendo à imagem de estáse. Aliás, justamente o seu primeiro caso havia apresentado ataques anteriores de malária.

A anemia tropical também seria outro fator coadjuvante, pois, nesta, ha forte trombose com freqüêntes hemorragias no cérebro devidas a uma "particular labilidade do sistema vascular".

No seu terceiro caso havia uma grave anemia tropical concomitante com fortes hemorragias sub-corticais antigas, no lobo parietal e hemiplegia, a qual surgiu tempos após a picada.

Rotter cita tambem Magalhães (1935) que observou hemiplegia em um paciente, 8 dias após a picada de uma cascavel, *Crotalus terrificus terrificus* e, em um outro individuo, 19 dias depois da picada de um escorpião, *Tityus serrulatus*. Ele julga que nestes casos, também deveriam existir perturbações funcionais análogas, e mais tarde, sobre o solo de lesões angionecróticas, produziram-se hemorragias por rexis. Posteriormente, Rotter admite que outros factores teriam sobrevindo em seus casos, levando a uma extensa trombopatia de quase todos os territórios venosos. Conclui que "nos casos de morte muitas horas após o envenenamento botrópico, se produz uma perturbação circulatória grave (hiperemia peri-estática) no sistema vascular cerebral" ("eine schwere Zirculationsstörung (periestatische Hyperämie) im Cerebralen Gefässystem"), a qual se reflecte em uma tumefacção cerebral, ou em um gráu mais forte de alteração circulatória, no infarto vermelho. Em consequência dessa alteração circulatória surgem angionecroses que podem levar mais tarde a hemorragias por hemiplegia. Tais lesões seriam ainda fortalecidas pela malária e pela anemia tropical existentes, anteriormente.

Fidler, Glasgow, Carmichael (1940) estudam as alterações patológicas experimentais provocadas pela injecção de veneno de *Crotalus atrox* ("Rattlesnake") na *Macaca mulatta*. Utilizam 9 macacos, pesando de 2.770 a 3.950 g. Dissolvem o veneno seco a 1% em solução fisiológica e dividem a solução em duas partes iguais, injectando em cada lado da região lombar. A dose é de 7 a 10 mg. por quilo de pêso. A autopsia foi feita 2 horas após a morte a qual

se dá em média 36 horas depois da injecção de veneno. Clinicamente, observam excitação, depois fraqueza progressiva. Não havia urina sanguinolenta. Na autópsia observam: gânglios linfáticos inchados e vermelhos com hiperplasia histiocitária. Coração: hemorragias nos tecidos sub-endocardicos do septo ventricular esquerdo em 6 animais sobre 9. Degeneração gordurosa do miocárdio. Em um animal. pequenas hemorragias sub-pleurais e sob a cápsula do fígado. Em 2 animais havia hemorragia do septo. Marcado edema hemorrágico *na pele, no ponto de inoculação,* com *lesões necróticas na parede dos pequenos vasos e dos capilares,* os quais *contêm trombos.* Em 3 animais, houve degeneração gordurosa dos túbulos renais. Supõem que a causa mortis mais provável tenha sido o choque. Não encontram lesões vasculares generalizadas. Somente uma perda subcutânea de sangue e de flúido.

Afirmam não terem encontrado no macaco nenhuma das lesões hemorrágicas ou exsudativas das alças glomerulares descritas por Pearce.

No cérebro e na medula espinhal, há apenas uma leve congestão nos pequenos vasos, meninges, substância cinzenta e branca. As alterações celulares não eram marcadas, mas "there was evidence of some chromatolysis". No pulmão, assinalam apenas que os capilares alveolares não era indubitavelmente distendidos. Nenhuma referência a trombos no interior de capilares. Rins: ligeira inchação turva e esteatose muito leve dos túbulos. Nenhuma lesão glomerular, excepto uma levissima tumefacção dos glomérulos.

As ilustrações dos autores são bastante pobres e escassas, demonstrando, somente hemorragias, no miocárdio, além de duas microfotografias em que os autores se referem a dois vasos no tecido adiposo e sub-cutâneo, os quais porém não são perceptíveis, pelo menos, nitidamente, nas figuras exibidas.

MATERIAL E METODO

No nosso trabalho, relataremos os resultados experimentais das pesquisas feitas em 2 lotes com um total de 24 animais, 21 dos quais foram injectados com veneno ófídico seco dissolvido em sôro fisiológico, nas doses inoculadas que se vêm nos protocolos dos quadros gerais de numero 1 e 2. anexos. Usamos o veneno seco de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) e, o veneno seco de *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius, 1768). (Na amostra de veneno seco de *B. jararaca,* a actividade marcada pela dose mínima mortal foi de 136 microgramas e, na de *C. t. terrificus,* de 1 a 2 microgramas. A dose mínima mortal é determinada em pombos de 250 a 320 g. de peso, por via endovenosa.) Destes animais, 15 foram inoculados com veneno botrópico (sendo 8 coelhos e 7 ratos) e 6 com veneno crotálico (4 coelhos e 2 ratos). Além destes animais, utilizamos mais 3 cães injectados com veneno crotálico em outro laboratório do Instituto e enviados (pelo Dr. M. P. Azevedo e Dr. I. Martirani) para exame, nesta secção.

QUADRO GERAL N.º 1

Animais inoculados com veneno de *Bothrops jararaca*

N.º do animal	N.º da necroscopia	Causa da morte	Especie animal e sexo	Peso corporal em gramas	Natureza da experiência: Via de inoculação	Tempo da 1.ª injeção até a morte: d	h	m	Quantidade total de veneno seco mg.	N.º de injeções. O veneno seco foi dissolvido em sol. fisiol.
1	14-48	Enven.	Coelho ♀	1.950	Endoven.			5 m	0,96	1 inj. de 2cm³
2	15-48	"	Coelho ♀	2.000	"			3	0,96	1 inj. de 2cm³
3	57-48	Sacrif. c/eter	Coelho ♂	1.350	Subcut.		30 h		25,00	a) 3 injs. de 2cm³ com 1mg. de ven. no 1.º dia, ás 10hs., 11hs., 14h.,15. b) 1 inj. de 4cm³ com 2mg de ven. no 1.º dia, ás 16h. c) 2 injs. de 10cm³ com 10mg de ven. no 2.º dia, ás 9h.,40m e 11h.,20m.
4	79-48	Enven.	Coelho ♂	1.350	"		5	30	50,00	1 inj. de 5cm³
5	80-48	"	Coelho ♂	2.000	"		6	20	40,00	1 inj. de 5cm³
6	81-48	"	Coelho ♂	2.000	"		22	50	40,00	1 inj. de 5cm³
7	82-48	"	Coelho ♂	1.515	"		6	54	20,00	1 inj. de 5cm³
8	83-48	"	Coelho ♂	1.750	"		71	30	50,00	a) 1 inj. de 5cm³ com 30mg de ven. no 1 dia, ás 9h.,30. b) 1 inj. de 5cm³ com 20mg de ven. no 3.º dia, ás 14h.
1	84-48	Enven.	Rato ♂	195	Subcut.		24 h		3,00	1 inj. de 3cm³
2	85-48	"	Rato ♂	212	"		24		4,00	1 inj. de 4cm³
3	86-48	"	Rato ♂	155	"		24		5,00	1 inj. de 5cm³
4	87-48	"	Rato ♂	200	"		48		2,00	1 inj. de 2cm³
5	88-48	Sacrif. c/eter	Rato ♂	165	"	6 d			6,00	1 inj. de 6cm³
6	184-48	"	Rato ♀	110	"		28	35 m	2,00	1 inj. de 1cm³
7	185-48	"	Rato ♂	110	"		10	35	2,00	1 inj. de 1cm³

QUADRO GERAL N.º 2

Animais inoculados com veneno de *Crotalus terrificus terrificus*

N.º do animal	N.º da necroscopia	Causa da morte	Espécie animal e sexo	Peso corporal em gramas	Natureza da experiência: Via de inoculação	Tempo da 1.ª injeção até a morte: d	h	m	Quantidade total de veneno seco mg.	N.º de injeções. O veneno seco foi dissolvido em sol. fisiol.
1	147-48	Enven.	Coelho ♂	2.165	Subcut.		27 h	30 m	2,00	1 inj. de 2cm³ ás 11h.
2	157-48	"	Coelho ♂	2.070	"		3	30	0,25	1 inj. de 0,5 cm³ ás 9h
3	179-48	"	Coelho ♀	2.115	"		27		4,00	a) no 1.º dia, 1 cm³ com 1 mg de ven., ás 9 h,30m b) no 2.º dia, 3m³ com 3mg de ven., ás 9 h,30m
4	183-48	Sacrif. c/ eter	Coelho ♂	2.000	"	23 d	4 h	30 m	41,45	a) no 1.º dia, 2.º, 3.º, 4.º, 6.º, e 9.º, 5cm³ com 50γ de ven., ás 9h,30m. b) no 3.º dia (ás 9h.), no 8.º (9h.,14m), no 13.º (ás 14h.) 0,5cm³ com 100γ de ven. c) no 10.º dia, 1cm³ com 300γ de ven., ás 10h. d) no 14.º dia, 1cm³ com 500γ de ven., ás 9h. e) no 15.º dia (ás 9h. 30m),no 17.º (ás 9h) 3cm³ com 3mg de ven. 16h) 1cm³ com 1000γ; no 18.º dia (ás 9h) 3cm³ com 3mg de ven. f) no 20.º dia 5cm³ com 5mg no 21.º dia 10cm³ com 10mg., no 23.º dia, 10cm³ com 20mg de ven., ás 9h,30m.
1	136-48	Enven.	Rato ♂	105	Subcut		51 h	40 m	1,50	a) no 1.º dia, 0,5cm³ com 500γ de ven., ás 9h,30m. b) no 2.º dia, 2cm³ com 1.000γ de ven., ás 9h,30m.
2	197-48	Sacrif. c/ eter	Rato ♀	100	"		52	40	1,50	a) no 1.º dia, 0,5cm³ com 500γ de ven., ás 9h,30m. b) no 2.º dia, 2cm³ com 1.000γ de ven., ás 9h,30m.
1	38-50	Sacrif.	Cão ♂	9.000			24 h		0,90	1cm³ com ven., ás 10h.

As injecções foram feitas por via subcutânea na região do dorso com excepção de 2 coelhos injectados por via endovenosa e 3 cães injectados por via intramuscular com veneno crotálico liofilizado.

Dos 15 animais injectados com *veneno botrópico,* 11 morreram num tempo que variou de 5 minutos até 71 horas e 1/2. Dos 4 sacrificados, variou o tempo de 28 horas e 35 minutos até 6 dias após a 1.ª injecção.

Dos 6 animais injectados com *veneno crotálico,* 4 morreram após um tempo que variou de 3 horas e 30 minutos até 51 horas e 40 minutos. Os 2 outros foram sacrificados de 52 horas e 40 minutos até 23 dias, 4 horas e 30 minutos após a 1.ª injecção.

Os cães, foram sacrificados 24 horas depois da injecção de veneno.

Pêso: (vêr nos quadros anexos)

Doses: conforme pode ser visto nos quadros gerais n.º 1 e n.º 2, as doses foram dadas, em alguns animais, em uma só vez, e em outros, várias doses distribuidas em um mesmo dia, ou em dias consecutivos, até um total de mais de 23 dias.

Não se procurou administrar o veneno de maneira uniforme em todos os animais mas sim de forma heterogénea, com o objetivo de provocar, eventualmente respostas lesionais diversas.

As doses totais variam de 250 microgramas até um total de 50 miligramas de veneno seco (vêr os quadros gerais n.º 1 e n.º 2).

Sintomatologia: — A sintomatologia consistiu, nos animais injectados por via endovenosa, em convulsões e morte por síncope respiratória e cardíaca, 5 minutos depois da injecção. Quanto aos demais casos, o coelho n.º 57-48, apresentou inapetência e a temperatura rectal foi de 39,5. Em outro caso, (n.º 80-48), o animal mostrou inapetência no 1.º dia, taquipneia, tremores musculares e prostração. Os reflexos estavam presentes. Morte no mesmo dia. Um outro animal (caso 179-48) apresentou-se abatido com taquicardia e com os olhos cheios de secreção.

Não foi feito exame de urina.

As *autópsias* foram executadas, geralmente logo após a morte.

Fixação: — Para o exame histopatológico retiramos, na maioria dos casos, u'a média de 15 a 20 ou mais órgãos, como: *pele* na região injectada e musculos, pele e musculos na parte oposta da zona inoculada, *pulmão, coração, timo, tiroide, rins, adrenais, figado, baço, estomago, intestino, glândula salivar, pâncreas, testiculo, epididimo, vesiculas seminais, hipófise, cérebro, cerebelo, ponte, bulbo* e *medula espinhal.*

Os órgãos nervosos, foram examinados, de modo geral, só por métodos comuns de coloração adiante mencionados, com o fim principalmente de pesquisarmos as alterações vasculares e inflamatória, bem como lesões celulares mais grosseiras.

E' nossa intenção procedermos ao estudo minucioso destes orgãos, por métodos electivos de coloração do tecido nervoso, em um trabalho futuro, no qual pretendemos investigar principalmente os núcleos de alguns nervos craneanos bulbares (núcleo do vago) e os núcleos do pavimento do 4.º ventriculo. Supomos, pois, que sem um estudo visando atentamente e especificamente esses núcleos, provavelmente não se poderá chegar a nenhuma conclusão de interesse neste género de intoxicação.

Os órgãos foram fixados em Bouin, formol salgado a 20% e, em alcool a 96%.

Os córtes foram feitos em congelação, e, após a inclusão em parafina.

Colorações: — Hematoxilina de Harris, Hematoxilina Férrica de Weigert, Tricromico de Masson, Van Gieson, Weigert para fibras elasticas e Escarlate R.

RESULTADOS

I — Aspecto macroscopico das lesões

A) Nos casos de *envenenamento botrópico.*

Na autópsia, nos casos de envenenamento botrópico, observam-se na *pele*, extensas zonas escuras de côr vermelho-arroxeada, tomando a zona da injeção, o dorso indo por vezes até o torax ou até a base da cauda ou mesmo até os membros posteriores. Tais àreas correspondem à intensa hiperemia e, às hemorragias com necrose do tecido celular subcutâneo, aprofundando-se até os músculos estriados subjacentes. Os pelos se destacam com facilidade. A zona necrosada, por vezes apresenta um exsudato não purulento com crostas secas.

A pele se destaca com facilidade. Em alguns casos houve formação de fístula na zona inoculada.

Mucosas: nada digno de nota.

Cavidade torácica:

Pulmões: em geral bastante congestionados. *Timus*: hemorragico em um caso (n.º 86-48).

Coração: nada digno de nota.

Cavidade abdominal:

Figado: hiperemia acentuada. *Baço*: Hiperemico. Hemorragia na face inferior e nos bordos, em um caso (n.º 86-48). *Rim*: hiperemico. Sufusões hemorrágicas sub-capsulares em um caso (n.º 87-48). Aumentados de volume e de coloração vermelho-escura em um caso (n.º 84-48). *Bexiga*: repleta de urina sanguinolenta em 2 casos (n.º 84-48 e 87-48).

Pancreas, Adrenais, Testiculo, Epididimo, Prostata, Vesiculas Seminais, Estômago, Intestino: — nada digno de nota.

Cavidade craniana:

Meninges, Encéfalo, Hipófise, Medula espinhal: nada digno de nota.

B) Nos casos de *envenenamento crotálico.*

Pele: em um animal (n.º 157-48), na autópsia, verificamos macroscopicamente pequeninas manchas escuras de 0,5 cm. de diâmetro com aspecto necrótico incipiente, no ponto inoculado. Nos demais casos, no local da injecção, nada digno de nota.

Intestino: congestão dos vasos das alças intestinais (n.º 147-48). *Figado*: coloração vermelho escura. *Rim*: enorme gráu de hiperemia, deixando sair grande quantidade de sangue na superfície do córte em um animal (n.º 147-48).

Esclerose renal em um caso (n.º 183-48). *Pulmão*: nada digno de nota. *Tiróide*: em geral ligeiramente congestionada. Aumentada de volume em 4 animais (n.ºs. 179-48; 183-48; 186-48; 187-48). *Coração*: sinais de pericardite em um coelho (n.º 183-48).

II — *Lesões histopatológicas*

A) *Veneno Botrópico.*

Pele: Extensas sufusões hemorrágicas que invadem o derma, hipoderma e a musculatura estriada subjacente. Na maioria dos casos, observam-se zonas de necrose do tecido gorduroso e de feixes de fibras musculares estriadas, cujos contornos ou sombras são visíveis, principalmente nas partes periféricas dos fócos. Trata-se de uma necrose de coagulação gangrenosa. A parte central destas àreas é em alguns casos liquefeita ou amolecida. Na parte periférica dos fócos, nota-se uma larga zona de reacção inflamatória exsudativa, caracterizada por intensa infiltração de granulocitos neutrófilos e. de linfocitos. Muitas fibras musculares estriadas dos feixes circunjacentes apresentam a degeneração hialina de Zenker. Os *capilares* e *pré-capilares* mostram-se extremamente dilatados e cheios de hemácias, estando em hiperemia peri e pré-estática. Na maioria deles, a parede é nitída, sem sinais de necrose. Alguns capilares chamam a atenção por estarem cheios por massas de glóbulos vermelhos aglutinados, hialinos, dando a imagem de estase propriamente dita, com a formação de trombos hialinos capilares. Tal facto, explica, a nosso vêr o mecanismo das hemorragias pericapilares e, das sufusões hemorrágicas por confluência, devidas à hiperemia na fase pré-estática. O edema, notável em muitos trechos, é explicado pela fase de periestase. Outros capilares mostram imagens de leucodíapedese. Em alguns capílares e pré-capílares, nota-se apenas um aspecto fragmentado ou dissociado das células endoteliais.

Em um coelho (n.º 57-48), notamos entre os planos de musculos estriados voluntários vizinhos, um vaso pré-capilar parcialmente tromboso, com endotelio ainda conservado, mas apresentando a parede de côr rosea homogénea, sem

nucleos, em típica hialinização ou hialino-necrose, conforme se vê no desenho colorido n.º 1.

Tal vaso reproduz fielmente a imagem de homogeneização da parede dos pré-capilares e arteriolas, tal como foi descrita por Werner Rotter, sendo que a imagem por nós referida, em desenho microscopico fiel do preparado, se superpõe exactamente à microfotografia n.º 1 do trabalho de Rotter, acima citado.

Em nosso caso, tais lesões foram encontradas somente nos capilares e pré-capilares, ou em vasos como o do desenho da figura n.º 1, que poderiam ser interpretados possivelmente como arteriolas, porém de calibre extremamente diminuto. Na verdade, todas as demais *arteriolas* que se encontram nos córtes, tanto nas zonas de necrose, como nas de simples edema e hemorragia, ou nas vizinhas das mesmas, apresentam a sua estrutura muscular lisa e endotelial, absolutamente íntegras, sem sinais de hialinização.

Pulmão: Marcante hiperemia em muitos casos, sem edema ou hemorragias. Em um caso (n.º 184-48), haviam hemorragias peri-capilares e intra-alveolares. Em outros casos foi consignada uma hiperemia moderada (3 coelhos e 3 ratos).

O que nos chamou a atenção desde o inicio, foi porém a presença, em muitos capilares e pré-capilares de figuras típicas de estase, com a formação de *trombos hialinos*, no seu interior (desenho das figs. 2 e 3) (n.º 83-48).

A freqüência dos trombos hialinos, nos casos de envenenamento botrópico, no pulmão, é sem duvida muito grande, pois nós a observamos em 5 casos tipicamente, e em 2 sob a forma de estase e pseudo-aglutinação bem manifesta, apenas sem a hialinização nitida das massas de eritrocitos, motivo pelo qual, consideramos duvidoso interpretar estas imagens, como de verdadeiros trombos capilares já formados.

É interessante notar que nos nossos 8 coelhos, existiam típicos trombos hialinos nos capilares pulmonares em 4 casos, sendo que em alguns, em pré-capilares e em uma arteriola (desenho n.º 4), (caso n.º 83-48). Em um caso, como relataremos adiante, encontramos trombos hialianos nos capilares do pâncreas (n.º 79-48). Portanto, constatamos 5 casos com trombos capilares, nos órgãos, em 8 coelhos inoculados.

Já nos ratos desta série, em numero de 7, foram encontrados trombos capilares do pulmão somente em 2 casos e, 1 caso foi duvidoso (n.º 86-48), além da trombose nos capilares da pele, no local injectado, encontrada em um outro caso (n.º 184-48).

Ausência de edema pulmonar.

Timus: Em 2 casos notamos forte hiperemia com dilatação dos capilares e das venulas, e, em um caso (n.º 81-48), pequenas sufusões hemorrágicas.

Coração: Pequenas hemorragias difusas em 3 casos n.ºs. 79-48; 80-48; 84-48), sendo que em 2, eram sub-endocardicas e intersticiais do miocárdio.

Havia miocardite intersticial sub-aguda ou crônica em fócos, predominantemente histiocitária, em 3 casos (n.ºs. 81-48; 82-48; 83-48).

Rim: Hiperemia dos glomerulos foi encontrada em 11 casos do total de 15 animais inoculados, sendo em 5 coelhos e 6 ratos. Em um coelho a hiperemia era muito intensa (n.º 83-48). Em 3 ratos era intensa (n.ºs. 84-48; 87-48; 185-48). Em um rato (n.º 87-48) havia hemorragia intra-glomerular e intra-capsular com hematúria. Neste caso, e em outro (n.º 84-48), foi constatada urina sanguinolenta na bexiga.

Interessante é notar que tais lesões hemorrágico-glomerulares só foram observadas, em nosso material, nos 2 ratos assinalados enquanto que, no coelho só foi observada hiperemia, sem fenomenos hemorrágicos. No rato (n.º 87-48), as lesões glomerulares hiperêmico-hemorrágicas lembram o quadro descrito em 1909 por Pearce, com veneno de *Crotalus adamanteus*. As lesões encontradas foram as seguintes, segundo refere o laudo respectivo: "os glomerulos apresentam intenso gráu de hiperemia. Muitos apresentam alças enormemente dilatadas e cheias de hemacias, não se percebendo por vezes núcleos nas paredes de algumas dessas alças de modo a dar impressão de uma necrobiose das mesmas. Vários glomerulos estão aumentados de volume e enchem completamente a cápsula. Em alguns vêem-se as hemácias livres na cavidade capsular, como si formassem pequenas hemorragias sub-capsulares. Em certos glomerulos, vêm-se massas hialinas entre as alças e a cápsula com os caracteres de fibrina. Em outros, têm-se a impressão de um aumento na quantidade de núcleos. Muitos núcleos são pequenos, assemelhando-se a neutrófilos. Muitos túbulos apresentam acentuada inchação turva e, degeneração vacuolar ou hidrópica bastante intensa. Muitos túbulos contêm cilindros hialinos. Outros túbulos apresentam granulações volumosas coradas pela eosina. Pelo Escarlate R, nota-se esteatose em ilhotas do cortex, abrangendo zonas dos tubos cortornados de 1.º ordem, proximas dos glomerulos. Diagnóstico: — Nefrose granulo-albuminoide intensa. Intensa hiperemia glomerular com pequenas hemorragias e necrobiose das alças glomerulares por glomerulonefrite aguda.

Fenomenos típicos de glomerulo-nefrite ou de glomerulite não encontramos, em nenhum outro caso.

Fenómenos de nefrose com inchação turva, acompanhada ou não de degeneração hidrópica, foram encontrados respectivamente em 9 casos, sendo 5 coelhos e 4 ratos. Degeneração hidrópica em um coelho (n.º 79-48) e em um rato (n.º 87-48). Esteatose dos túbulos em um rato (n.º 87-48).

Não assinalamos aqui lesões secundárias ou, associadas de nefrite intersticial por serem extremamente freqüêntes em animais de laboratório e não terem assim relação aparente com as nossas experiências.

Fígado: Havia hiperemia em 6 coelhos e em 3 ratos, em um total de 9 animais. Inchação turva dos hepatocitos, esteatose, degeneração hidrópica, em 9 casos em gráu variáveis em (6 coelhos e 3 ratos).

Fenómenos inflamatórios de hepatite não têm interesse no nosso estudo.

Baço: — Hemorragias difusas em um caso (n.º 79-48). Hiperemia em 3 coelhos e em 1 rato. Hiperplasia histiocitária da polpa em 6 coelhos e 4 ratos. Hialinose das arteriolas centro-foliculares em 1 coelho (n.º 79-48).

Pâncreas: — Ausência de lesões dignas de nota a não ser um gráu notável de hiperemia com trombos hialinos nos capilares em um coelho, (n.º 79-48).

Adrenais: — Nada digno de nota a não ser a presença de um foco hemorrágico de forma eliptica presente na zona fasciculada em um rato (n.º 184-48). Havia lipoidose da fasciculada em 5 casos (coelhos).

Sistema Nervoso: — Hiperemia das leptomeninges em 2 casos (n.ºs 57-48; 184-48), um coelho e um rato. Não encontramos trombos hialinos capilares no sistema nervoso.

Encefalite expontânea em 7 casos. Meningite em ligeiro gráu em 2 casos.

Bulbo: — Hiperemia das leptomeninges em 1 caso.

Quanto às *lesões das células nervosas*, como antes já dissemos, é nosso intúito, fazer o seu estudo minucioso em um trabalho futuro com as técnicas histológicas apropriadas para a investigação do parênquima dos centros nervosos. Entretanto, podemos declarar desde já que com os métodos comuns das técnicas empregadas, encontramos com freqüência imagens de degeneração isquêmica das células segundo Spielmeyer, e, por vezes, lesão homogeinizante da mesma, com as alterações características do citoplasma e do núcleo, tanto em células piramidais do cortex cerebral e do sector de Sommer do corno de Ammon, como em células de Purkinje e, em neurónios dos núcleos centrais do cerebelo, bem como nos núcleos da base do 4.º entrículo, nos núcleos de nervos motores bulbares e também em grandes neurónios da formação reticulada bulbo-protuberancial.

B) *Veneno crotálico*

Pele: — Conforme foi descrito só foram encontradas lesões macroscópicas na pele, em 1 caso (n.º 157-48). O exame histológico desse caso não revela lesões dignas de nota.

Apenas nos *musculos estriados*, subjacentes notamos necrobiose de muitas fibras musculares com desintegração vacuolar das mesmas. Moderado exsudato de granulocitos neutrófilos no conectivo intersticial.

Pulmão: — Hiperemia moderada em alguns casos e, em gráu bastante marcada em outros. Em um caso nota-se uma substância hialina, porém com aspecto de plasma coagulado no interior dos vasos (n.º 183-48). Em outro,

apenas havia forte hiperemia com aparência de aglutinação de hemácias nos capilares do pulmão.

Chamamos a atenção para esse facto, que nos parece extremamente significativo, de que em nenhum de nossos casos de envenenamento crotálico, nos foi dado encontrar, verdadeiros trombos hialinos nos capilares do pulmão, ao contrário do que observamos nos casos de envenenamento botrópico, nos quais este fenómeno se apresentou com bastante freqüência.

Coração: Em um caso em que as injecções se prolongaram por mais de 23 dias (coelho n.º 183-48), encontramos zonas de degeneração fibrinoide sub-endocárdicas, devidas possivelmente à sensibilização do endocárdio pelas múltiplas injecções do antigênio.

Nada de particular nos demais casos.

Rim: Marcante hiperemia dos glomerulos em 6 animais, (2 coelhos, 2 ratos e 2 cães), sendo principalmente acentuada em 3. Em um cão (n.º 38-50), em que havia nefrite crônica com intensa esteatose degenerativa da porção ascendente das alças de Henle e dos túbulos, ao lado de áreas de necrobiose do epitélio tubular, encontramos alguns glomérulos hiperemiados e outros raros com hemorragias. Alguns glomérulos apresentavam tumefacção das alças capilares ou necrose das mesmas. Em outro cão (n.º 45-50), havia inchação turva dos túbulos, com marcante inchação turva e hipertrofia das células dos glomerulos com nítida basofilia. Presença de albumina coagulada, na luz da capsula de Bowman. Tumefacção dos glomerulos e nefrite intersticial crônica.

Em um coelho (n.º 179-48) havia pielo-nefrite crônica, vendo-se vários glomerulos com uma ou mais alças hialinizadas, reproduzindo aspectos de uma amiloidose. Inchação turva e degeneração granulo-hialina nos túbulos.

No coelho injectado durante mais de 23 dias com um total de 41 miligramas e 450 microgramas de veneno distribuido em 17 injecções e depois sacrificado, em que havia degeneração fibrinoide do endocárdio, encontramos largas àreas cicatriciais no cortex, dando o aspecto de um rim retraído macroscopicamente, sendo normal a maioria dos glomerulos, nas zonas restantes.

Inchação turva de túbulos com degeneração granulo-hialina havia em 3 animais; cilindros hialinos em 2; esteatose em 2 (n.ºs. 35-50 e 40-50), sendo da parte ascendente das alças de Henle no cão n.º 40-50 e das alças de Henle e dos tubos contornados no cão n.º 38-50. Neste animal, havia também intensa hiperemia em alguns glomerulos e isquemia na maioria deles, com partes necrosadas dos glomerulos: vêm-se algumas alças sem núcleo, com necrose das paredes e de aspecto turvo. Nos glomérulos isquemiados, as alças se mostram ricas em núcleos e tumefeitas; nos glomérulos hiperemiados, ao contrário, há necrose de parte das alças.

Em outro cão (n.º 40-50), os glomerulos são volumosos e ricos em núcleos principalmente endoteliais, enchendo quase completamente a cápsula de Bowman.

Em muitos córtes, vêm-se os capilares glomerulares cheios de hemácias. Nefrite intersticial crônica e pielite em gráu moderado.

Finalmente, no terceiro cão, (n.º 45-50), havia intensa inchação turva, hipertrofia e nitida basofilia das células dos glomerulos. Presença de albumina coagulada na luz da capsula de Bowman. Capilares dos glomerulos dilatados, porém, por vezes vazios. Ausência de degeneração gordurosa dos tubulos.

Em conclusão, achamos que nos 3 cães examinados, há sinais evidentes de lesões glomerulares no sentido de uma *glomerulo-nefrite aguda*, porém *em fócos*, e não difusa, ao lado de nefrose.

Adrenais: — Hiperemia de alto grau assinalada em um rato (n.º 187-48).

Baço: — Hiperemia intensa em 3 coelhos, em 1 rato e em 1 cão. Hiperplasia histiocitária, principalmente nos centros reacionais dos foliculos em 1 rato, e 2 cães.

Pancreas: — Hiperemia intensa em 1 rato.

Figado: — Hiperemia em 3 coelhos, em 2 ratos e em 1 cão. E um cão (n.º 40-50), foi encontrada trombose em ramos venosos portais:

Sistema nervoso: — Hiperemia em 4 animais, sendo 2 coelhos, 1 rato e 1 cão, sendo intensa em um caso (n.º 183-48) no cerebelo, cortex e núcleos centrais. Em um rato com hiperemia (n.º 187-48), haviam também hemorragias difusas no cérebro e nas lepto-meninges. Em um cão (n.º 40-50) haviam hemorragias peri-capilares pequenas na medula espinhal e no bulbo.

Encefalite expontânea só havia no coelho (n.º 147-48) e em 1 cão (n.º 40-50).

Lesões neuronais: repetimos as ressalvas feitas para o estudo das lesões do envenenamento botrópico. Encontramos degeneração isquémica das células nervosas, principalmente no corno de Ammon, no cortex cerebral, no cerebelo, principalmente em 2 coelhos (n.ºs. 147-148 e 183-48) e nos 3 cães examinados.

No cão n.º 45-50, havia além da degeneração isquémica no corno de Ammon, lesão homogeneizante das células de Purkinje e, além disso, lesões extremamente curiosas destas células, com vacuolização e aspecto esponjoso, com nítida tumefacção baloniforme desses elementos. Tais lesões, que lembram fortemente certos aspectos das lesões neuronais caracteristicas da idiotia amaurótica, no homem ,deverão ser objecto de um estudo posterior, com os métodos apropriados de técnica neurohistológica. Devemos anunciar porém, desde já, que as lesões eram acompanhadas por um notavel grau de proliferação histiocitária nos gânglios linfáticos e no baço desse animal, factos esses sem dúvida dignos de nota por estarem associados, chamando assim a atenção ainda mais para a semelhança com a afecção referida.

Nos gânglios linfáticos, os macrofagos histiocitários enchiam os seios e os cordões. No baço, a hiperplasia histiocitária se notava tanto nos centros foliculares, onde se apresentava em gráu intenso e nos cordões de Billroth. As fibras musculares lisas das trabeculas eram manifestamente hiperplasicas.

DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dos resultados acima, podemos concluir de que as lesões encontradas no ofidismo experimental, quer pelo veneno botrópico, quer pelo veneno crotálico, são sem dúvida sob o ponto de vista anátomo-patológico morfológico, discretas e de evidenciação bastante delicada e difícil. Realmente do conjunto das lesões descritas, aquelas que com certeza podem ser relacionadas com o veneno, exceptuando-se as únicas lesões intensas encontradas que são as existentes na pele e nos músculos subjacentes, no envenamento botrópico, são somente de órdem vascular, principalmente, no domínio dos capilares sanguíneos, como foi descrito por Mitchell, Pearce, Rotter, Fidler e outros.

Em nossos casos, foram encontradas, principalmente, pequenas hemorragias, ocasionais em vários órgãos; intensa hiperemia, frequênte, em várias visceras; a trombose hialina, amiudada em certos órgãos. Em alguns casos apareceram lesões renais glomerulares.

I — *Hiperemia*

São alterações que além de serem inespecíficas, apresentam ora, um gráu moderado, ora um gráu intenso, em certos casos, às vezes até notável, não havendo porém nenhuma diferença apreciável em relação à sua intensidade entre os 2 grupos de animais injectados. Foi assinalada principalmente no pulmão, figado, rim, baço, glândulas salivares, adrenais e hipófise.

No sistema nervoso, a hiperemia parece ser de gráu mais intenso no envenamento crotálico.

II — *Hemorragias*

No envenamento botrópico, encontramos fócos hemorrágicos, ora difusos, ora delimitados com caracter peri-capilar, no timus, em um coelho (n.º 81-48); no pulmão, com carater peri e intra-alveolar, em um rato (n.º 184-48) e na adrenal, neste mesmo animal; no coração em 2 coelhos, (n.ºs. 79-48 e 80-48), sendo no primeiro caso, difusas no miocárdio e no segundo em fócos sub-endocárdicos pericárdicos e intersticiais, no miocárdio. No rim, em um rato (n.º 87-48), sob a forma de pequenissimas lesões glomerulares hemorrágicas. A bexiga continha urina sanguinolenta em 2 ratos (n.ºs 84-48 e 87-48). Baço com hemorragias difusas em um coelho (n.º 79-48). Em todos esses casos tratava-se de envenenamento botrópico.

No envenenamento crotálico, encontramos hemorragia do tecido adiposo peri-adrenal em um coelho (n.º 147-148) e no cérebro de um rato (n.º 187-48), no qual apresentava um caracter difuso, afectando o cerebro e as meninges moles. No cão n.º 40-50, haviam pequenas hemorragias peri-capilares, na medula espinhal e no bulbo.

Assim sendo, em resumo, não observamos a hemorragia no sistema nervoso, nenhuma vez no envenenamento botrópico, enquanto que no crotálico nós a observamos em 2 casos n.ºs 187-48 e 40-50. Quanto às vísceras, deu-se o contrário, não se observando hemorragias no envenenamento crotálico senão em 2 casos, no tecido adiposo periadrenal de um coelho (n.º 147-48) e no rim, onde foram vistas as delicadas lesões hemorrágicas glomerulares descritas no cão n.º 38-50.

Ao contrário, nos casos de envenamento botrópico, as hemorragias foram mais freqüentes, encontrando-se, além das hemorragias da pele, fócos hemorrágicos em 6 casos do total de 15 animais (4 coelhos e 2 ratos). Assim no envenenamento botrópico, as hemorragias ocorreram em um coelho (n.º 79-50) no coração e no baço; em outro (n.º 80-48), no coração; nos restantes, respectivamente, no timus (n.º 81-48), no pulmão (n.º 57-48), no rim (n.º 87-48), no pulmão e na adrenal (n.º 184-148).

Assim sendo, as hemorragias são ao que parece, no caso do veneno de *Bothrops jararaca*, bem mais freqüêntes do que no envenenamento por *Crotalus terrificus terrificus*.

Esses nossos achados diferem dos descritos por Pearce que, com veneno do *Crotalus adamanteus*, na America do Norte, obteve com grande freqüência hemorragias viscerais, no coelho.

Julgamos que tais hemorragias não parecem poder explicar a morte do animal, pelo seu caracter inconstante e pela sua pequena intensidade.

III — *Trombose hialina nos capilares*

É esta uma lesão que, mau grado o seu pequeno vulto e a delicadeza do seu reconhecimento cuja diagnóstico requer extremo cuidado e atenção, nos pareceu de grande importância em nossas observações. Ela foi encontrada em 9 casos em um total de 15 animais com veneno botrópico, dando uma frequência de 60%. Si excluirmos 2 animais injectados por via endovenosa, teremos em 13 animais inoculados por via subcutânea, 9 casos de trombose hialina nos capilares, dando uma frequência de 69%. Isso só ocorreu no lote de animais com veneno botrópico, não tendo sido encontrado, nem uma vez sequer de modo indubitável, no lote de veneno crotálico.

QUADRO COMPARATIVO N.º 1

Lesões histopatológicas principais nos envenenamentos por *Bothrops jararaca* e por *Crotalus t. terrificus*

LESÃO	ÓRGÃO	Veneno Botrópico	Veneno Crotálico
Hemorragia	Pele	+	—
	Rim	+ (2 casos)	—
	Coração	+ (3 casos)	—
	Adrenal	+ (1 caso)	—
	Cerebro	—	+ (1 caso)
	Meninges	—	+ (1 caso)
	Bulbo	—	+ (1 caso)
	M. Espinhal	—	+ (1 caso)
	T. adiposo periadrenal	—	+ (1 caso)
Hemorragia Glomerular	Rim	+ (2 casos)	—
Sinais histológicos de glomerulo-nefrite aguda.	Rim	—	+ (3 casos)
Trombos hialinos em capilares e em arteriolas.	Pulmão	+ (7 casos 51 %)	—
	Pancreas	+ (1 caso)	—
Necrose e inflamação hemorragico necrotizante.	Pele	+	—

No grupo de veneno crotálico, encontramos apenas em um animal, imagens de aglutinação de hemácias em capilares do pulmão, porem sem forma típica de trombos hialinos. Em um cão (n.º 40-50), foram encontrados trombos venosos, porem em ramificações portais do figado.

Desse modo, nos parece que a trombose hialina capilar é quase que especifica do envenenamento botrópico experimental (coelho e rato). É sobretudo interessante observar a sua frequência no pulmão, onde ela foi encontrada em 7 casos do total de 9 casos positivos em 15 animais com veneno botrópico, cerca de 47%. Si excluirmos 2 animais injectados por via endovenosa, teremos em 13 animais do lote de veneno botrópico injectado por via subcutânea, 7 casos

positivos, dando 54%. Entretanto julgamos que será necessario maior número de animais para se chegar a uma conclusão definitiva sobre esses achados.

Contudo, em vista da frequência dessa lesão no envenenamento botrópico, em contraste com a sua ausencia no envenenamento crotálico, julgamos que devemos salientar a grande significação prática da mesma que poderia servir para o diagnóstico diferencial da causa mortis ou do género de envenenamento, nos casos de ofidismo.

QUADRO COMPARATIVO N.º 2

Lesões mais frequentes dos órgãos, nos envenenamentos por *Bothrops jararaca* e por *Crotalus t. terrificus*

ORGÃO	LESÕES	VENENO BOTRÓPICO	VENENO CROTÁLICO
aparentemente mais caracteristicas	Pele	Necrose, hemorragias, inflamação hemorragico-necrotizante	——
	Pulmão	Trombos hialinos em capilares e em arteriolas (7 casos 54%)	——
aparentemente menos caracteristicas	Sistema nervoso	——	a) Hiperemia intensa do cerebelo (2 casos). b) Hemorragias no cerebro e em meninges (1 caso). c) Hemorragias no bulbo e na medula espinhal (1 caso).
	Rim	a) Hiperemia e hemorragia intraglomerular e intracapsular (1 caso). b) Urina hemorragica (2 casos). c Nefrose moderada.	a) Intensa hiperemia glomerular. b) Ausência de hemorragia c) Glomerulo-nefrite aguda.
	Pâncreas	Trombo hialino capilar (1 caso)	——

Realmente, pudemos comprovar em várias ocasiões, no decurso de nossas pesquisas que toda vez na qual o exame histopatológico de fragmentos de pulmão indicava a presença de trombos hialinos nos capilares, podiamos levantar a suspeita ou fazer o diagnóstico de que provavelmente se tratava de envenenamento botrópico, o que em nossos casos foi sempre confirmado. Porem nos casos

negativos, nada se póde afirmar, pois como vimos pela frequência de porcentagem encontrada, não se póde afastar a possibilidade de se tratar também de um caso de envenenamento botrópico. Quer nos parecer porem que nos casos negativos, a maior probabilidade é de que se trate de envenamento crotálico.

IV — *Lesões glomerulares*

Quanto às lesões glomerulares, podemos também salientar de que no *envenenamento botrópico* não observamos, nem uma vez sequer, lesões que pudessem ser filiadas a qualquer tipo de glomerulo-nefrite, não só difusa, como focal. Portanto de nossos achados, julgamos poder afirmar pela ausência de glomerulo-nefrite no envenenamento botrópico experimental pelo menos nas espécies de animais utilizadas em nossas experiências (coelho e rato). Ao contrário, esse veneno produz no homem lesões evidentes de glomerulite, como foi observado por Mac-Clure e também por nós em um caso humano que será publicado.

Quanto ao *envenenamento crotálico,* não podemos afirmar a mesma coisa em relação à glomerulo-nefrite, pois 3 cães estudados por nós apresentaram sinais evidentes de glomerulo-nefrite em focos.

Em relação à hiperemia e, às lesões glomerulares de tipo hiperemico-hemorrágico, como antes já referimos, são realmente frequêntes tambem nas espécies de animais de laboratório, segundo Pearce e outros autores. A frequência é quase igual nos dois grupos de envenenamento ofídico experimental (hiperemia glomerular em 11 casos de envenenamento botrópico em um total de 15, e em 6 casos de envenenamento crotálico em um total de 9 animais. Havia hemorragia glomerular evidente em 1 caso em cada um dos 2 lotes de animais com veneno).

CONCLUSÕES

1. — No envenamento por *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), as hemorragias são frequêntes em vários orgãos internos e, raras no sistema nervoso;

2. — No envenamento por *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius, 1768), as hemorragias são raras nos órgãos internos e, frequêntes nos centros nervosos;

3. — No envenenamento botrópico é frequênte a trombose hialina dos capilares do pulmão cuja lesão poderá servir como um sinal diagnóstico diferencial do género de envenenamento ofídico;

4. — No envenenamento crotálico, não existia, nem uma vez sequer, a trombose hialina, nos capilares pulmonares;

5. — A trombose hialina dos capilares do pulmão poderá constituir, portanto, um sinal diferencial de grande valor, provavelmente patognomónico, no diagnóstico histopatológico do envenenamento botrópico, uma vez que

tal lesão venha a ser confirmada em um material experimental mais abundante;

6. — A hialinonecrose da parede capilar e arteriolar, descrita por Rotter, só foi encontrada em 1 caso experimental de envenenamento botrópico na pele, no local da injecção;

7. — No envenenamento botrópico, encontram-se lesões hiperemico-hemorrágicas glomerulares, no rim, idênticas àquelas descritas por Pearce, no envenenamento pela cascavel norte-americana, *Crotalus adamanteus;*

8. — Porem não há lesões de glomerulo-nefrite focal ou difusa, no coelho e no rato, no envenenamento botrópico experimental;

9. — Ao contrário, no cão, encontram-se sinais de *glomerulo-nefrite em focos,* no ofidismo experimental pelo veneno de *Crotalus terrificus terrificus;*

10. — As lesões produzidas nos órgãos, no ofidismo experimental variam, segundo a espécie zoológica dos animais empregados e, conforme a qualidade do veneno que depende do género e da espécie zoológica da serpente doadora do mesmo.

RESUMO

Os autores relatam as lesões histológicas encontradas em um grupo de 24 animais injectados com veneno ofídico dos quais, um primeiro lote de 15 animais (8 coelhos e 7 ratos) com veneno de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), um segundo lote de 9 animais (4 coelhos, 2 ratos e 3 cães) com veneno de *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius, 1768). Dois coelhos foram inoculados por via endovenosa, 3 cães foram injectados por via intramuscular, e os animais restantes, subcutâneamente. Os animais foram autopsiados em um tempo que variou de 5 minutos, 1, 2, 4 até um total de mais de 23 dias depois da primeira injecção de veneno. As quantidades totais de veneno variaram de 250 microgramas até 50 miligramas, introduzidas por um única dose ou distribuidas por várias doses em dias consecutivos.

Além da forte hemorragia e do edema com necrose de coagulação do tecido celular subcutâneo e dos musculos estriados voluntários subjacentes, no lugar da injecção, as principais lesões no envenamento botrópico experimental consistiram, no seguinte:

1) As hemorragias eram amiudadas em vários órgãos internos, nos animais inoculados com veneno botrópico. No envenenamento crotálico, as hemorragias são raras, nos órgãos internos e ao contrário, repetidas, no sistema nervoso. Desse modo, parece aos autores que as hemorragias viscerais são mais frequêntes, no ofidismo experimental por *Bothrops jararaca* do que

no envenenamento crotálico experimental pelo *Crotalus terrificus terrificus* (America do Sul) e também talvez pelo *Crotalus adamanteus* (America do Norte) cujo veneno foi estudado por Pearce.

2) A trombose hialina nos capilares foi encontrada, no lote de 15 animais injectados com veneno botrópico em 9 casos (60%), sendo que no pulmão, em 7 casos (47%). Mas com a exclusão de 2 coelhos injectados por via endovenosa, há em 13 animais inoculados por via subcutânea, 9 casos de trombose hialina dos capilares (69%) e, no pulmão, em 7 casos (54%). Esse facto ocorreu exclusivamente, no lote com veneno botrópico e nem uma vez sequer no grupo com veneno crotálico. Por essa razão, os autores chamam a atenção para o valor prático que poderá ter tal lesão para o diagnóstico diferencial do envenenamento ofídico. Até hoje, não se havia atribuido tal importância por outros investigadores à essa lesão.

A hialino-necrose da parede capilar e arteriolar, como foi descrita por Rotter, só foi encontrada em 1 caso, na pele, no lugar da injecção, no grupo inoculado com veneno botrópico.

3) Quanto às lesões renais, os autores descrevem, no ofidismo botrópico experimental, somente lesões hiperemico-hemorrágicas, em partes idênticas àquelas descritas por Pearce, no envenamento experimental pelo *Crotalus adamanteus* (America do Norte). Comtudo, não acharam nos animais injectados com veneno de *Bothrops jararaca*, os sinais de glomerulonefrite encontrada no homem por Mac-Clure (em picado por *Bothrops jararacussu*) e também pelos autores em um caso humano, em curso de publicação. Unicamente, em 3 cães do grupo injectado com veneno de *Crotalus terrificus terrificus* (America do Sul) acharam os sinais de glomerulonefrite em focos.

O tipo de lesão produzida nos órgãos, no envenenamento ofídico, parece depender da espécie zoológica dos animais usados nas observações e varia de acôrdo com a qualidade do veneno que por sua vez depende do género e da espécie da serpente doadora do mesmo.

SUMMARY

The authors relate in detail the histological lesions found in 24 animals inoculated with snake venom. The first lot of 15 animals (8 rabbits and 7 rats) was injected with the venom of *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) and the second lot of 9 animals (4 rabbits, 2 rats, 3 dogs) was injected with the venom of *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius, 1768). Two rabbits were inoculated intravenously, 3 dogs received intramuscular injections and the rest were injected subcutaneously. The animals were autopsied within a period ranging from 5 minutes to 1, 2, 4 and up to 23 days after the first injection of the

venom. The doses (0,25 — 50,00 mg) were administered either all at once or distributed over several consecutive days.

Besides severe hemorrhage and edema, with coagulation necrosis of subcutaneous cellular tissue of the voluntary striated muscles subjacent to the place of injection, the principal lesions in the cases of experimental bothropic poisoning, were as follows:

1) Hemorrhages were frequently found in the internal organs of animals inoculated with bothropic venom. In crotalic poisonings they were rarely present in the internal organs but, on the contrary, more often found in the nervous system. Thus, it seems to the authors that visceral hemorrhages appear more frequently in cases of experimental poisoning by *Bothrops jararaca* than in experimental crotalic poisoning by *Crotalus terrificus terrificus* (South America), and perhaps by *Crotalus adamanteus* (North America) as described by Pearce who demonstrated that the venom of *C. adamanteus* produces hyperemic-hemorrhagic glomerular lesions in the kidney.

2) In the lot of 15 animals injected with bothropic venom, hyaline thrombosis in the capillaries was found in 9 cases (60%), 7 cases (47%) of which were of the lung. However, excluding 2 endovenously injected rabbits, there are 9 cases of hyaline thrombosis in the capillaries of 13 animals inoculated (69%), 7 cases (54%) of which are of the lung. This fact occurred only in the lot with bothropic venom and not once in the lot with crotalic venom. For this reason, the authors call attention to the practical value which such a lesion may have in the diagnosis of snake poisoning, after this fact has been confirmed in a larger number of cases. Up to the present, other investigators have not attributed such importance to the above mentioned lesion.

   Hyaline necrosis of the capillary and arteriolar walls, as described by Rotter, was found in only one case in the skin at the place of injection.

3) With regard to renal injuries, only hyperemic hemorrhagic glomerular lesions are described in bothropic poisoning, in part identical to those described by Pearce in experimental poisoning with *Crotalus adamanteus* (North America). However, no signs were found of glomerulonephritis in the animals with bothropic venom such as were found in man by Mac-Clure (*Bothrops jararacussu*) as well as by the authors in one human case now in course of publication. Signs of focal glomerulonephritis were found only in the 3 dogs inoculated with the venom of *Crotalus terrificus terrificus*. Therefore, the type of lesion produced in the organs by snake poison seems to depend on the zoological species of the animal used in the

observation. It also varies in accordance with the quality of the poison, which in turn depends on the genus and probably also on the zoological species of the serpent from which the poison was obtained.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser beschreiben eingehend die an 24 Tieren durch Schlangengift hervorgerufenen histologischen Schädigungen. 15 Tiere (8 Kaninchen und 7 Ratten) erhielten Gift von *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) und 9 Tiere (3 Hunde, 4 Kaninchen und 2 Ratten) Gift von *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius, 1768) injiziert. Das Toxin wurde bei 2 Kaninchen appliziert. Die 3 Hunden intramuskulär und bei den übrigen Tieren subkutan appliziert. Die Giftdosen (0,25 — 50,00 mg) wurden entweder auf einmal gegeben oder auf mehrere aufeinanderfolgende Tage verteilt. Die Sektion der Tiere wurde 5 Minuten und 1, 2, 4 bis mehr als 23 Tage nach der ersten Giftinjektion vorgenommen.

Bei experimenteller *Bothrops* — Vergiftung wurden ausser starken Hämorrhagien und Oedem mit Koagulationsnekrose des Unterhautzellgewebes an der Injektionsstelle und der darunterliegenden quergestreiften Muskulatur hauptsächlich folgende Veränderungen beobachtet:

1) Blutungen in verschiedenen inneren Organen der mit *Bothrops* Gift beandelten Tieren wurden öfters beobachtet. Bei *Crotalus* — Vergiftung waren diese selten, während hierbei widerum öfters Blutungen im Nervensystem beobachtet wurden. Die Verff. haben daher den Eindruck, dass viscerale Hämorrhagien bei experimenteller *Bothrops* — Vergiftung häufiger sind als nach Applikation von Giften der Klapperschlangen, und zwar sowohl des südamerikanischen *C. t. terrificus* wie auch vielleicht des nordamerikanischen *C. adamanteus,* dessen Toxin von Pearce untersucht wurde, der fand, dass es hyperämischhämorrhagische Glomerulusschädigungen hervorruft.

2) Unter den 15 mit *Bothrops*-Gift behandelten Tieren wurde in 9 Fällen (60%) hyaline Kapillarthrombose beobachtet, davon 7 mal (47%) in der Lunge. Wenn man 2 intravenös injizierte Kaninchen von der Betrachtung ausschliesst, zeigten 9 der restlichen 13 Tiere hyaline Kapillarthrombose (69%), davon 7 in der Lunge (54%). Diese Beobachtung wurde ausschliesslich bei *Bothrops*-Vergiftung gemacht und nicht ein einziges Mal bei *Crotalus*-Intoxikation. Falls dieses Phänomen an Weiterem Untersuchungsmaterial bestätigt wird, möchten die Verff. auf seine mögliche Bedeutung für die Differentialdiagnose der Schlangenbissvergiftung hinweisen, was andere Forscher bisher unterlassen haben.

Hyaline Nekrose der Kapillar — und Arteriolarwand, wie sie Rotter beschreibt, wurde nur in einem Falle in der Haut der Injektionsstelle angetroffen.

3) Von Nierenschädigungen durch experimentelle *Bothrops*-Vergiftung wurden nur hyperämisch-hämorrhagische Glomerulusveränderungen beobachtet, die teilweise mit den von Pearce mit *C. adamanteus*-Toxin erhaltenen identisch sind. Anzeichen von Glomerulonephritis, wie beim Menschen von Mac-Clure nach Biss von *Bothrops jararacussu* und in einem Falle auch von den Verff. beobachtet (im Verlauf der Publikation) wurden bei den mit *B. jararaca*-Gift behandelten Tieren nicht gesehen. Nur bei 3 Hunden, die Injektionen von *C. t. terrificus*-Toxin erhalten hatten, wurden Zeichen von Glomerulonephritisherden gefunden. Der Typ der durch Schlangengift an den Organen bewirkten Schädigungen scheint daher von der zoologischen Species der Versuchstiere abzuhängen. Er verändert sich ausserdem auch noch je nach den Eigenschaften des Giftes, die ihrerseits wieder von der Gattung und wahrscheinlich sogar der Art der das Toxin liefernden Schlange abhängen.

Agradecemos à Sra. Lucilia M. Amorim que voluntariamente fez os desenhos coloridos que ilustram o nosso trabalho. Igualmente, somos gratos à V. Mondim e à M. A. de Toledo pelas preparações histologicas e pelas manipulações biológicas. Agradecemos tambem a A. Seixas, as microfotografias e à C. Franke, as traduções.

BIBLIOGRAFIA

1. *Amaral, A. do* — Notas sobre a Ofiologia Neotropica e Brasilica. *Papeis avulsos do Departamento de Zoologia,* **5**: 29-40, 1944. Secretaria da Agricultura. São Paulo, Brasil.
2. *Amorim, M. de Freitas, R. Franco de Mello & F. Saliba* — Sur la Formation de Thrombes Hyalins dans les Capillaires Pulmonaires dans l'Empoisonnement Experimental par le Venin Bothropique. *International Congress of Clinical Pathology* — 16-20 July 1951. London, England.
3. *Amorim, M. de Freitas, R. Franco de Mello & R. A. Aun* — Lesões Pulmonares e Renais em um caso de Envenenamento Ofídico Humano (*Em curso de publicação*).
4. *Azevedo, A. P. de & J. Castro Teixeira* — Intoxicação por Veneno de Cobra. Necrose Simetrica do Cortex Renal. Uremia. *Mem. do Instituto Oswaldo Cruz.* **33**: 23-38, 1938.
5. *Bates*-Rep. Health-Department of the Panama Canal Zone. 1925-27. (*Cit. por W. Rotter*).
6. *Costa, J. Celestino da* — O Problema da Trombose considerado sob o Angulo da sua Patologia Geral. *Boletim Clinico dos Hospitais Civis de Lisboa.* **13**; n.os 2, 3, 4, 1949. Portugal.

7. *Evons, N. and E. W. Gilbert* — Symmetrical Cortical Necrosis of the Kidneys. *Am. Jaurn. Pothal.*, 12: 553-560, 1936.

8. *Flexner, S. and H. Naguchi* — The Constitution of Snake Venom and Snake Sera. *Univ. Penn. Med. Bull.* 25: 35, 1902. (Cit. por *Pearce*).

9. *Fidler, H. K., R. D. Glosgow and E. B. Carmichoel* — Pathological Changes produced by Subcutaneous Injection of Rattlesnake (*Crotalus*) Venom into *Mocaco mulotto* monkeys. *Am. Jaurn. of Pathol.* 16: 355-364, 1940.

10. *Hunter, W. K.* — The Histological Appearance of Nervous System in Krait and Cobra Poisoning. *Glosgow Med. Journ.* 59: 81, 1903.

11. *Magalhães, O. de* — Hemiplegias Organicas provocadas pelos Venenos Ophidico e Escorpionico. *Revista Medico-Cirurgico do Brosil.* 43: 113-118, 1935.

12. *Moc-Clure, E.* — Glomerulonefrite aguda diffusa, consequente a envenenamento por cobra (*Bathrops jararacussu*). *Bal. Secret. Saude e Assistencia.* 1: 35-49, 1935. Rio de Janeiro.

13. *Mac Clure, E.* — Glomerulonefrite Aguda Difusa. 1946. Rio de Janeiro.

14. *Mallary, F. B.* — Cases of Snake-Bite Treated in Almirante Hospital, Panama, During the Years 1922-1926, Inclusive by *H. R. Eichelbaum* — Autopsy Record on a Fatal Case-Microscopic Pathology (Dr. Mallory). *Fifteenth Annual Report. Medical Department. United Fruit Comp.* 15: 237-240, 1926. Boston.

15. *Mitchell, S. W.* — Researches upon the Venom of the Rattlesnake; with an Investigation of the Anatomy and Physiology of Organs concerned. *Smithsanian Contrib. Know.* 12: 1-158, Art. VI, 1860. (*Cit. par Fidler*).

16. *Mitchell, S. W.* — Experimental Contributions to the Toxicology of Rattlesnake Venom. *New York Med. Jaurn.* 23: January, 1868. (*Cit. par Pearce.*)

17. *Mitchell, S. W. and E. T. Reichert* — Researches upon the Venoms of Poisonous Serpents. *Smithsonian Contrib. to Know.* 26: 647, 1886. *Cit. par H. Naguchi*).

18. *Moare, R. A.* — Textbook of Pathology. 1.1338, 513 figs. Philadelphia, 1944.

19. *Naguchi, H.* — Snake Venoms — An Investigation of Venomous Snakes with Special Reference to the Phenomena of their Venoms. *Carnegie Inst. af Woshington*, 1909. Publ. 111.

20. *Pearce, R. M.* — An Experimental Glomerular Lesion by Venom (*Crotalus adamonteus*). *Jaurnol af Exp. Med.* 11: 532-540, 1909.

21. *Ratter, W.* — (Costa Rica) — Beitrag zur pathologischen Anatomie und Histologie der Ophidismus. *Virchows Arch. f. path. Anatomie.* 301: 409-416, 1938.

22. *Scriver, W. M. ond H. Oertel* — Necrotic Sequestration of the Kidneys in Pregnancy (Symmetrical Cortical Necrosis). *Journal Path. ond Bacterialagy.* 38: 1071-1094, 1930.

23. *Succno, A.* — Anuria Ophidica. *Brosil Medica*, 41: 1194, 1927.

24. *Toube, H. N. ond H. W. Essex* — Pathologic Changes in the Tissues of the Dog following Injections of Rattlesnake Venom. *Arch. af Pathal.* 24: 43-51, 1937.

25. *Wilson, P.* — Snake Poisoning in the United States; a Study based on an Analysis of 740 Cases. *Arch. Int. Med.* 1: 516-570, 1908. (Cit. por Fidler).

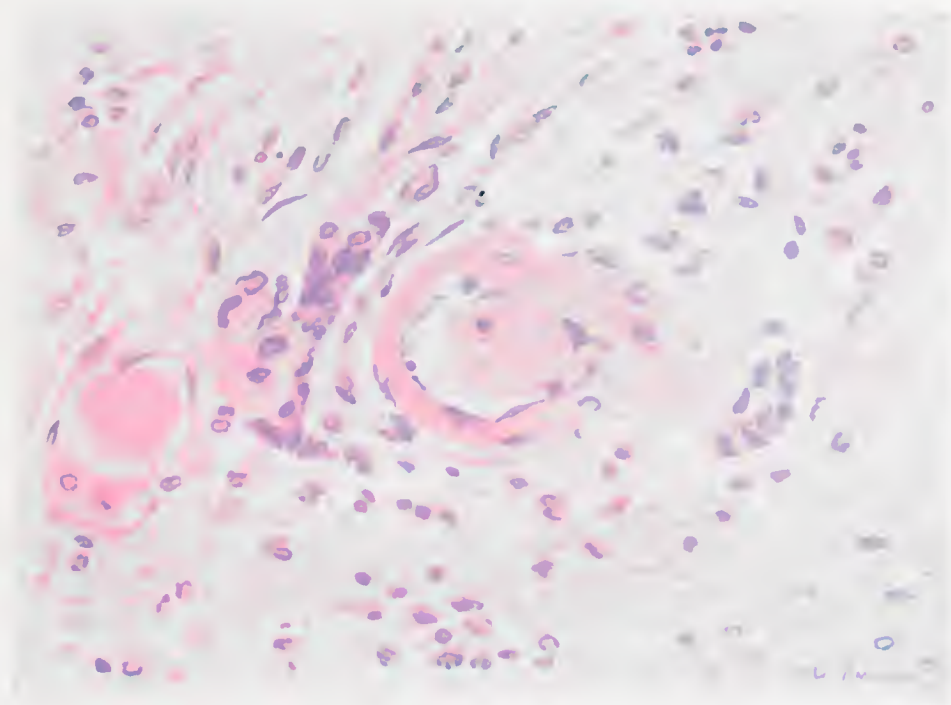



FIGURA N.º 1

Arteriola com hialino-necrose da parede com ruptura de um lado, contendo pequenas massas trombóticas hialinas. Edema e exsudato inflamatório do conectivo em torno do vaso. Um capilar em pré-estase, à esquerda. Pele do coelho n.º A (57-48), inoculado com 25 mgm de veneno botrópico. Coloração por H. E. (Microsc. binoc. Zeiss Obj. 40, Oc. K 10). Desenho de Lucilia Maia Amorim.

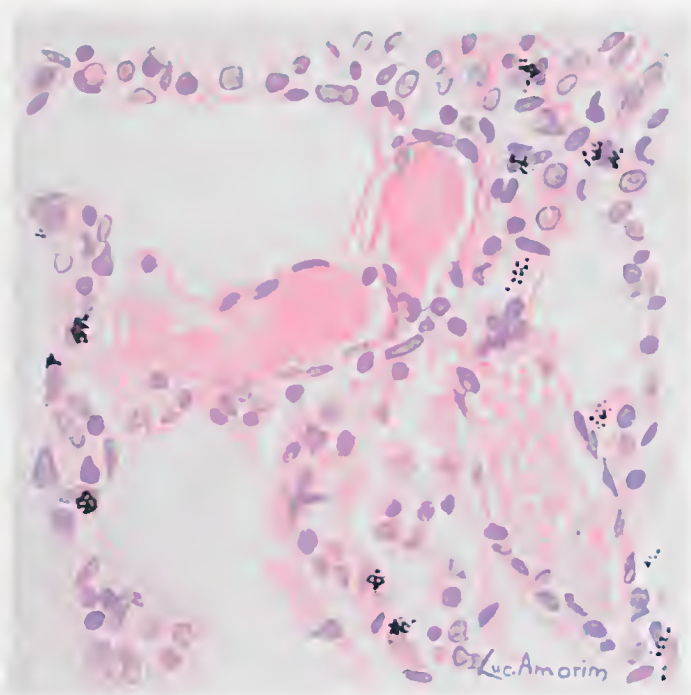



FIGURA N.º 2

Pulmão de coelho, forte aumento, coloração por H. E. Notam-se a esquerda e no centro, dois capilares, contendo trombos hialinos no interior. No angulo inferior direito da figura, há um capilar normal, contendo eritrocidos bem isolados. Coelho n.º A (83-48), injectado com 50 mgm de veneno botrópico. (Microsc. Zeiss binoc., Obj. 40, Oc. K 10). Desenho de Lucilia Maia Amorim.

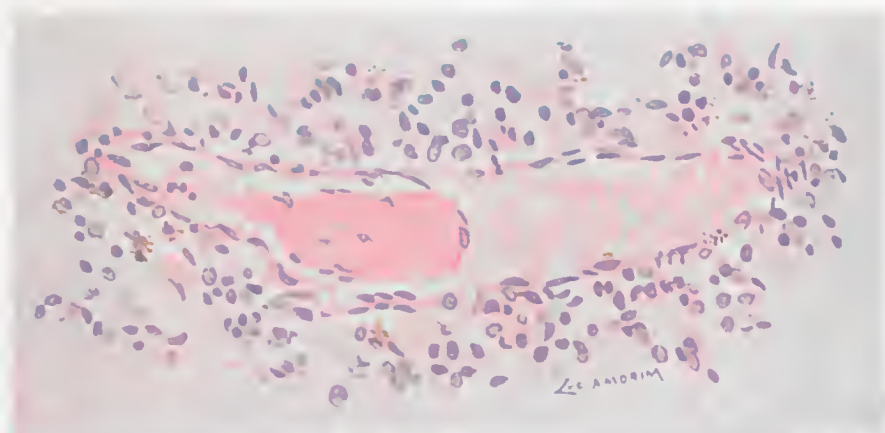



FIGURA N.º 3

Um pré-capilar de pulmão do mesmo caso anterior, contendo de um lado uma pequena massa trombótica e do outro, eritrocitos isolados. Coelho n.º A (83-48), injectado com 50 mgm de veneno botrópico. (Microsc. Zeiss binoc. Obj. 20, Oc. 6). Desenho de Lucilia Maia Amorim.

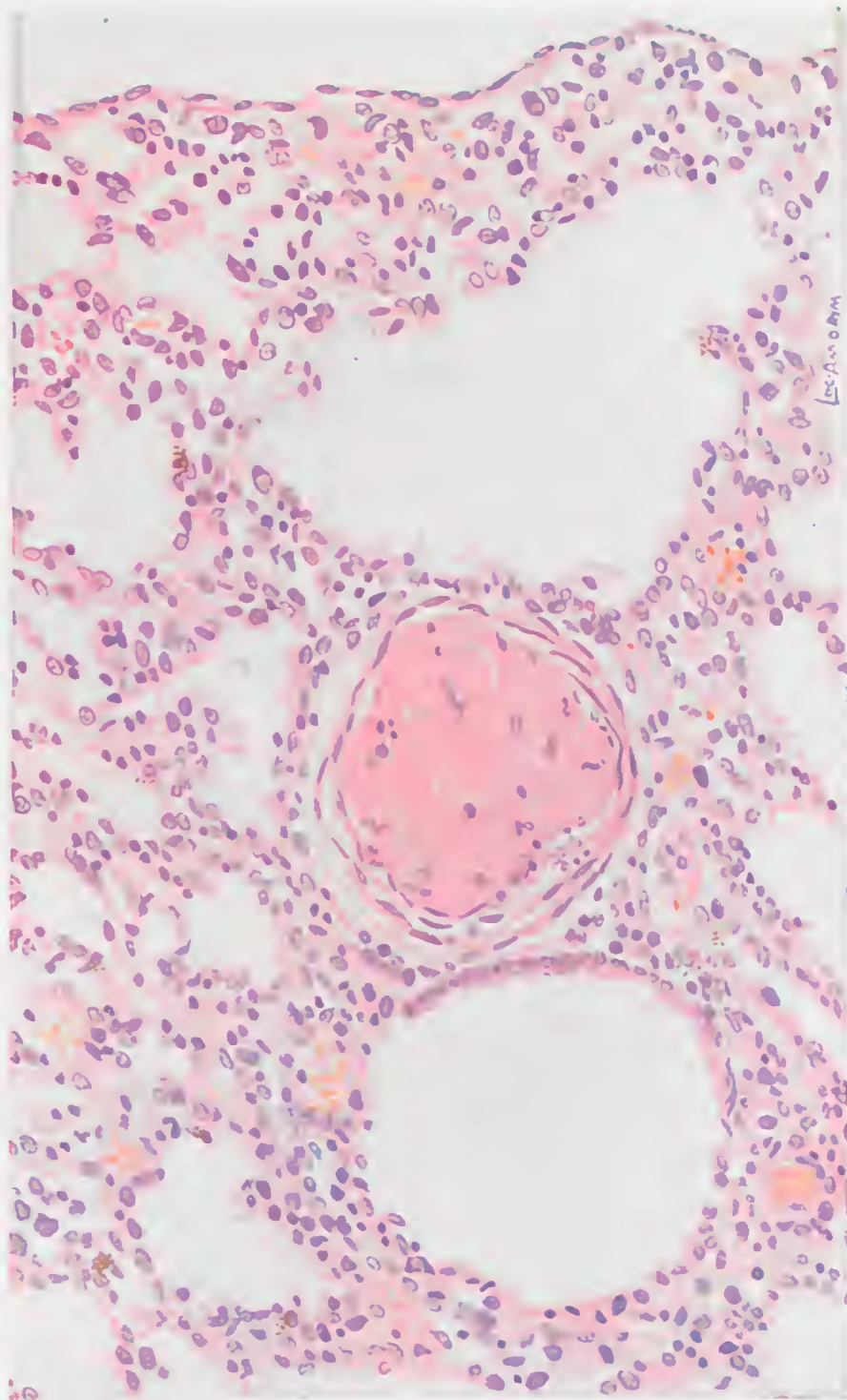



FIGURA N.º 4

Pulmão do coelho n.º A (83-48) do mesmo caso anterior, mostrando uma arteríola com o lume obliterado por uma massa trombótica. Fibras musculares visíveis na parede do vaso. No lado esquerdo da figura,

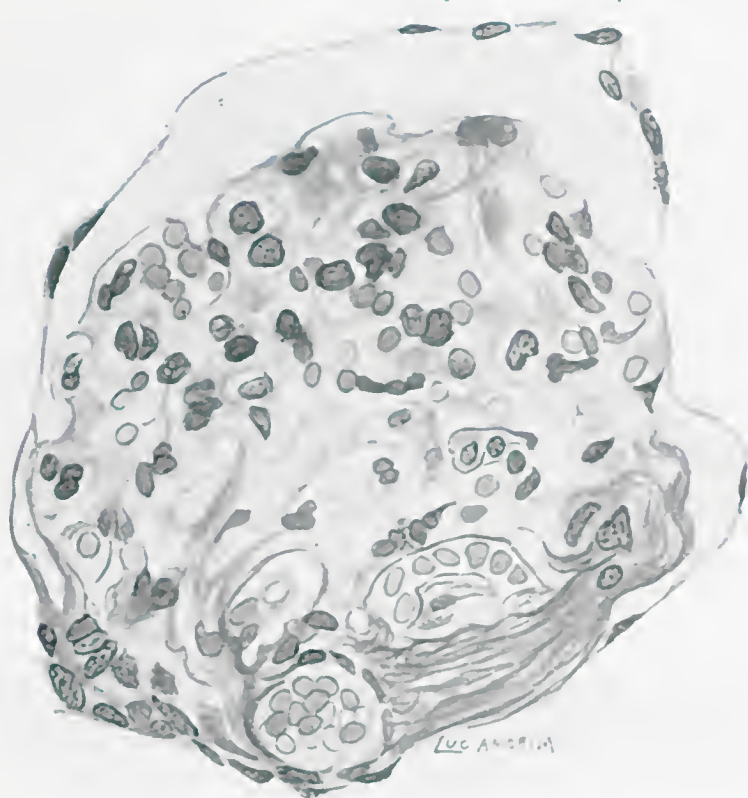



FIGURA N.º 5

Rim do rato n.º A (87-48), injectado com mgm de de veneno botrópico. Nota-se à direita, em baixo entre o glomerulo e o folheto externo da cápsula de Bowman, a presença de massas de fibrina filamentosa. Sinequia de alças glomerulares e da cápsula, à esquerda. Coloração pela H. e E. (Microscop. Zeiss binoc. Obj. 40, Oc. K 10). Desenho em branco e preto por Lucilia Maia Amorim.

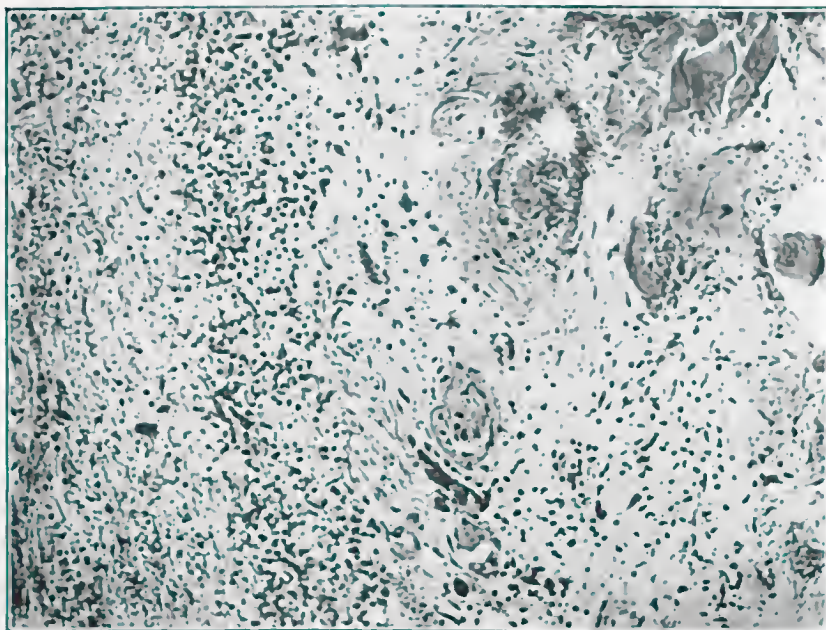



FIGURA N.º 6

Microfotografia correspondente ao desenho da figura n.º 1, porém com um aumento de 150 diâmetros. Coelho n.º 57-48, injectado com 25 mg. de veneno botrópico. Ver a descrição da figura n.º 1. Pele. Coloração por H. E.

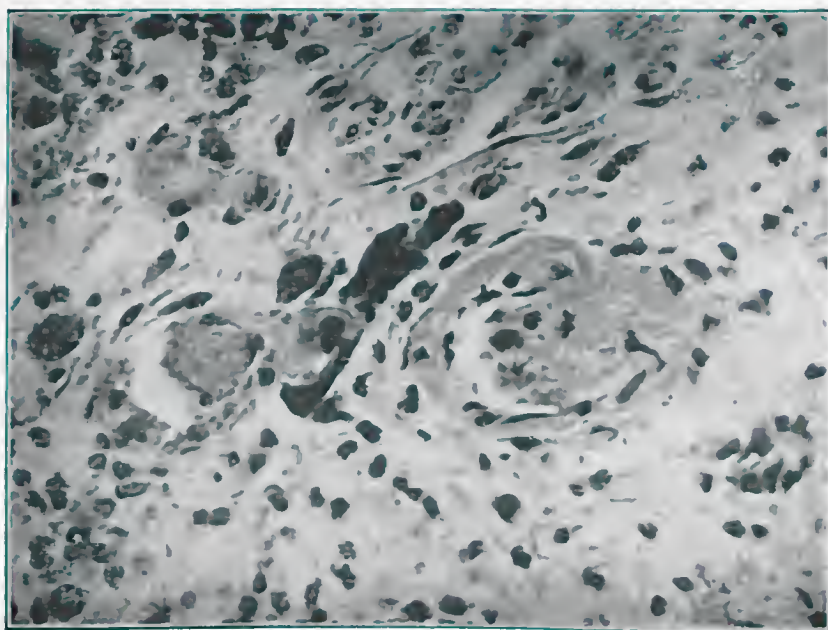



FIGURA N.º 7

É o mesmo córte histológico da figura n.º 6, mas com uma ampliação de 450 vezes. Comparar com o desenho colorido da figura n.º 1 que é o mesmo córte com a mesma descrição. Pele do coelho n.º 57-48 injectado com 25mgm de veneno botrópico. Coloração por H. E.

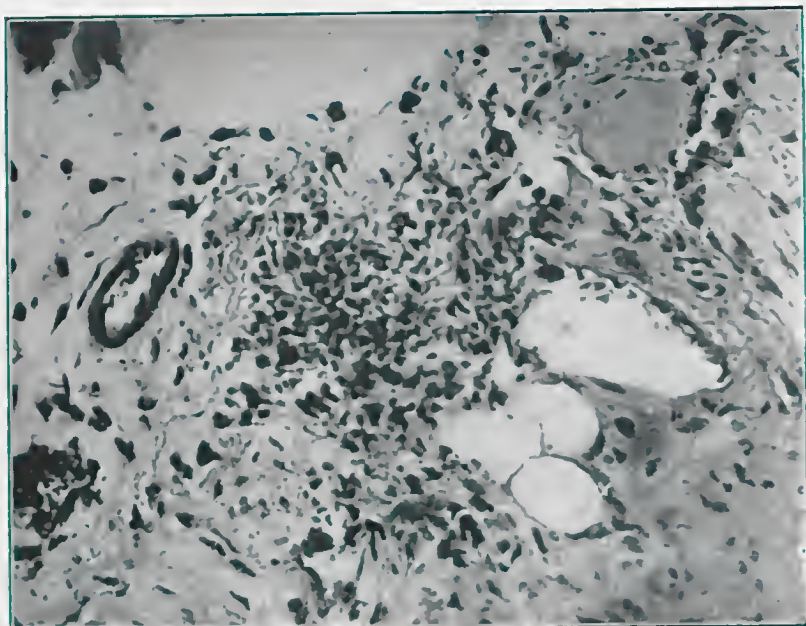



FIGURA N.º 8

Zona da inoculação do veneno, mostrando a reação inflamatoria. A direita e em cima, avista-se um capilar trombosado. Pele do coelho n.º 57-48 injectado com 25 mgm de veneno botrópico. Microfotografia com um aumento de 380 vezes. Coloração por H. E.

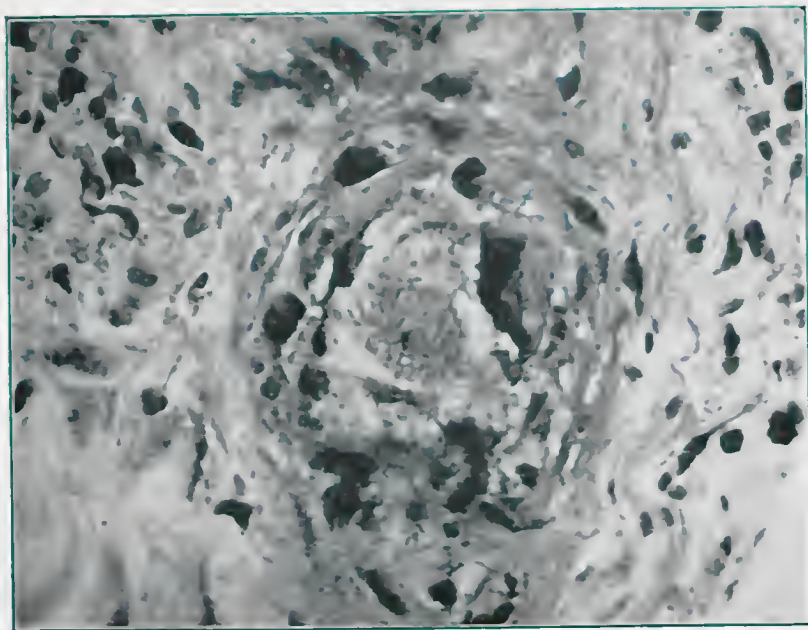



FIGURA N.º 9

Necrose de uma arteriola na zona inflamada do hipoderma onde o veneno foi introduzido. Pele de coelho n.º 57-48 que recebeu 25mgm de veneno botrópico. Microfotografia x 730. Coloração por H. E.

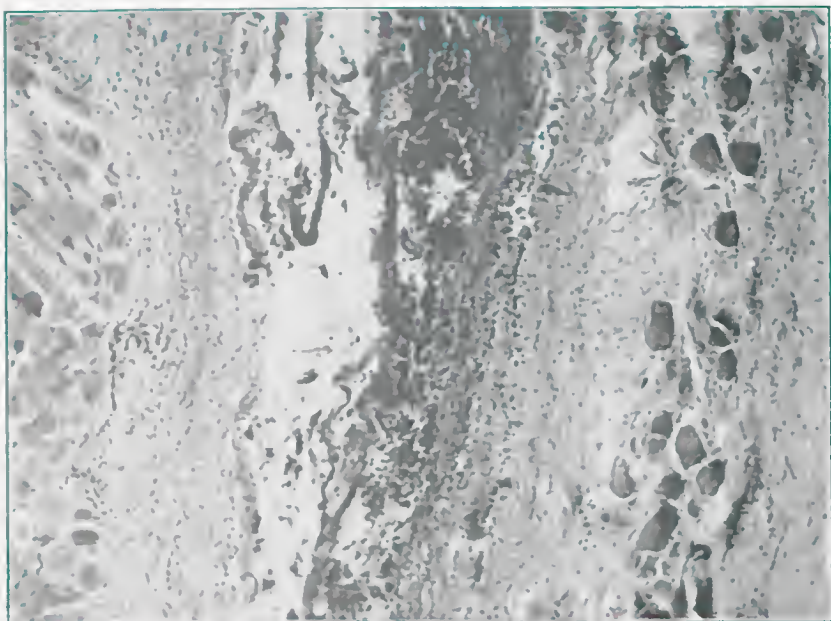



Figura n.º 10

Local da inoculação do veneno. Zona de necrose e de hemorragia entre os feixes musculares estriados. Rato n.º 8348 que recebeu 1 injecção de 4 mgm de veneno botrópico. Microfotografia de corte de pele com um aumento de 90 vezes. Coloração por H. E.

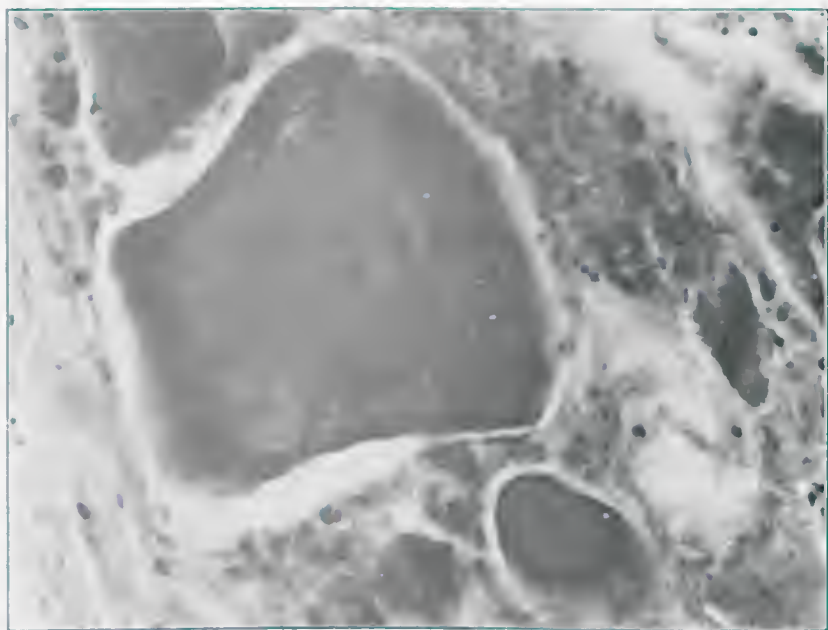



Figura n.º 11

Musculatura no ponto de inoculação do veneno. Degeneração hialina das fibras musculares voluntárias, vendo-se detritos de celulas necrosadas em torno das mesmas. Coelho n.º 8348 injectado com 50 mgm de veneno botrópico por via subcutânea. Microfotografia x 750. Coloração por H. E.

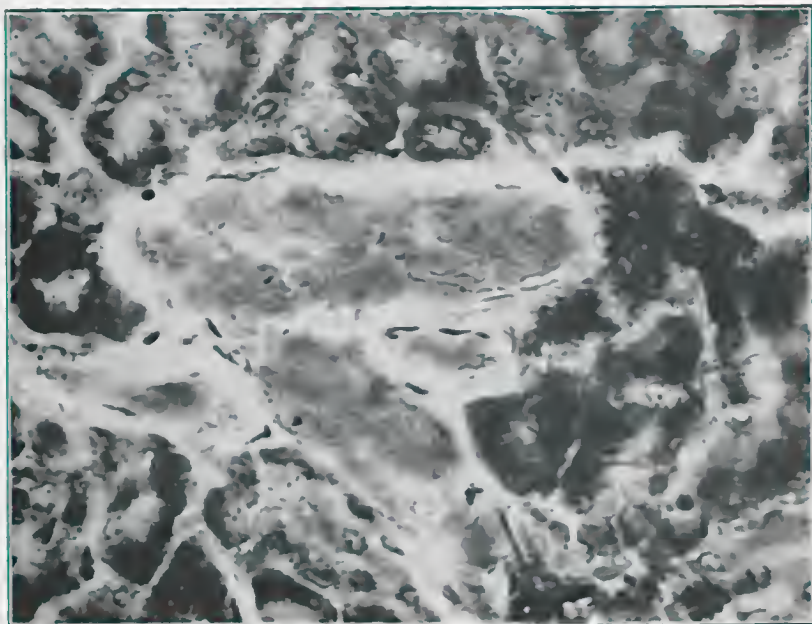



FIGURA N.° 12
Pancreas. Precapilar, mostrando os seus ramos trombosados. Coelho inoculado com 50mgm. de veneno botrópico. Animal n.° 79-48. Microfotografia x 570. Coloração por H. E.

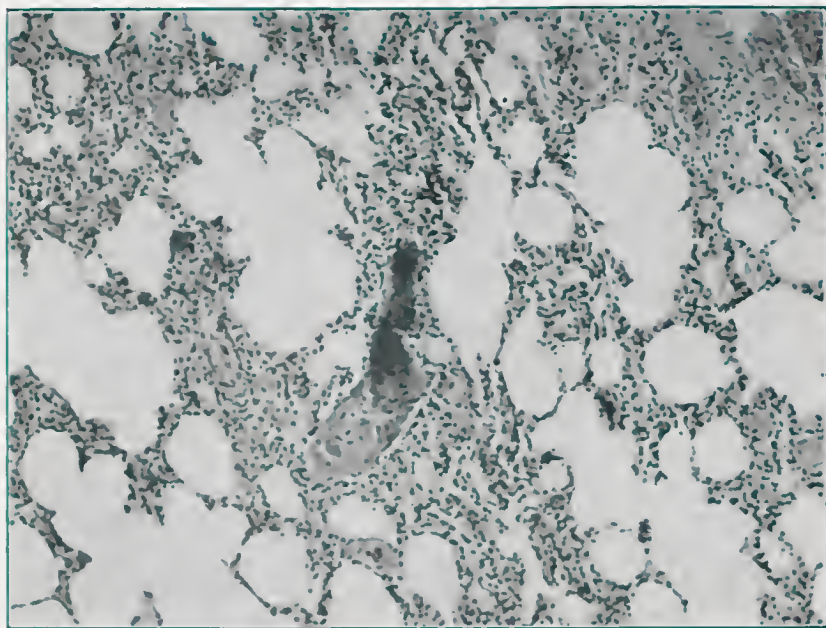



FIGURA N.° 13
Pulmão. Vista de conjunto do pulmão no qual sobressai, claramente um precapilar trombosado. Microfotografia x 130. Coelho n.° 83-48 injectado com 50 mgm de veneno botrópico. Coloração por H. E.

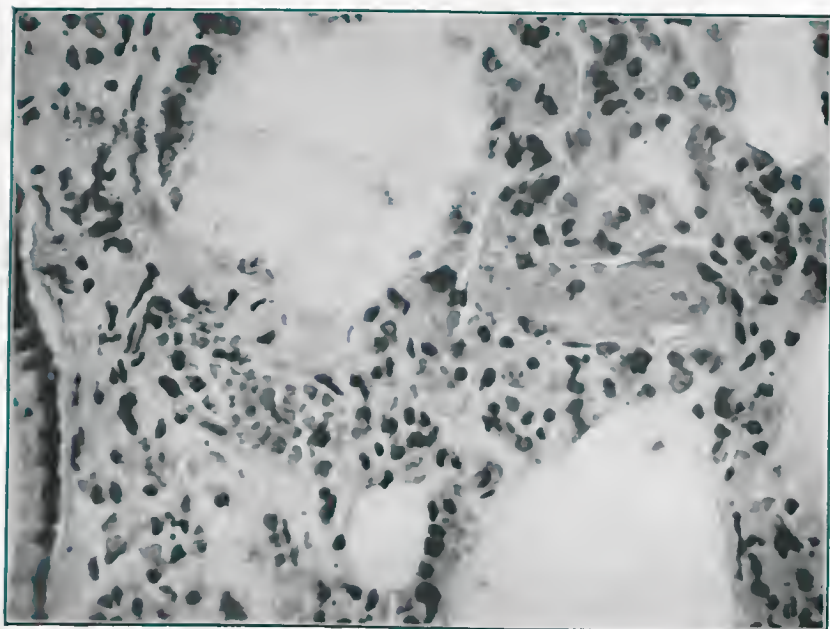



FIGURA N.º 14

Pulmão. A esquerda, vê-se um capilar dilatado com o lume cheio de hemácias. A direita há um capilar com o lume obliterado por um trombo hialino. Coelho n.º 83-48, injectado com 50 mgm de veneno botrópico. Coloração por H. E. Microfotografia x 530.

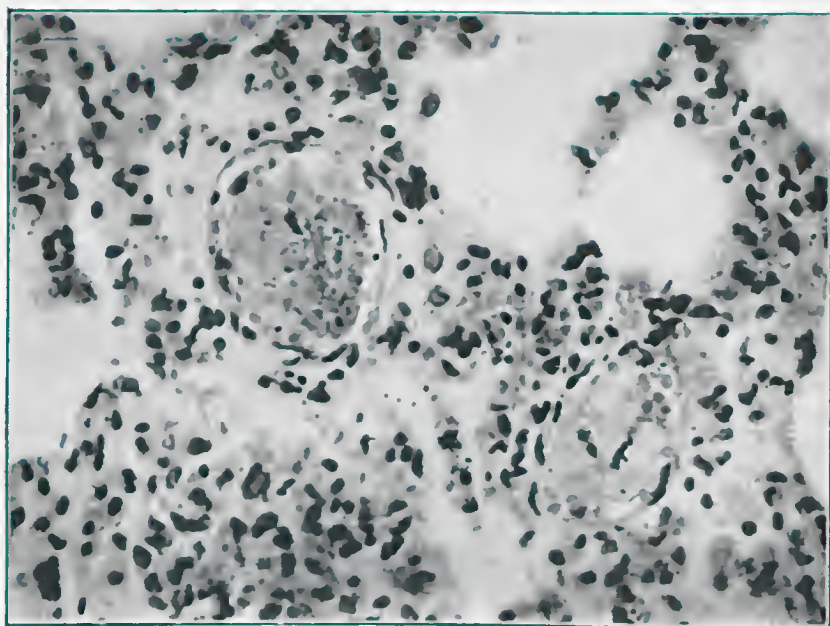



FIGURA N.º 15

Pulmão. Dois capilares enormemente dilatados com os seus lumes quase totalmente trombosados. Somente existem algumas hemacias soltas em um lados dos capilares. Coelho n.º 83-48 injectado com 50mgm de veneno botrópico. Coloração por H. E. Microfotografia x 480.

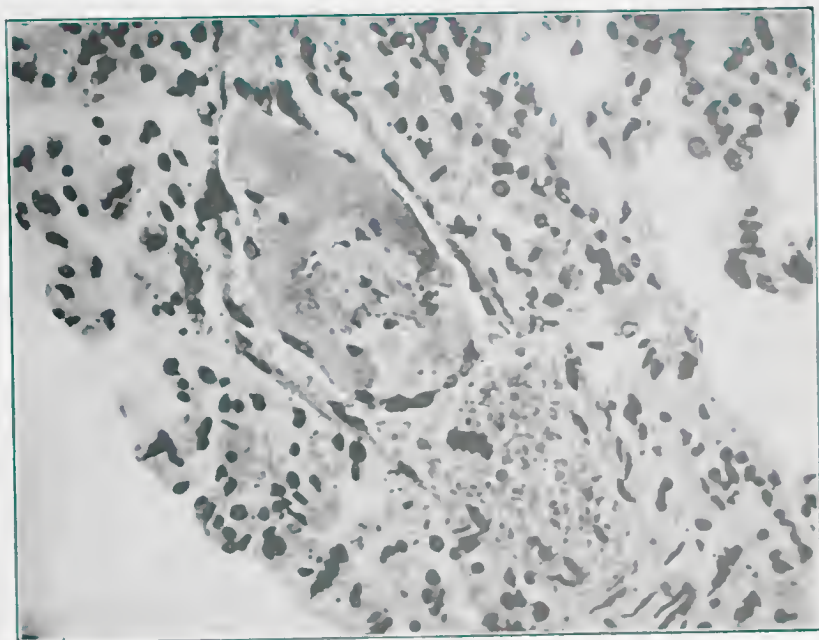



Figura n.º 16

Pulmão. Precapilar com o lume parcialmente obliterado por um trombo típico que está já, em parte delimitado por células endoteliais. A outra parte do lume apresenta os eritrocitos livres. Coelho n.º 83-48 inoculado com 50 mgm de veneno botrópico. Coloração por H. E. Microfotografia x [illegible].

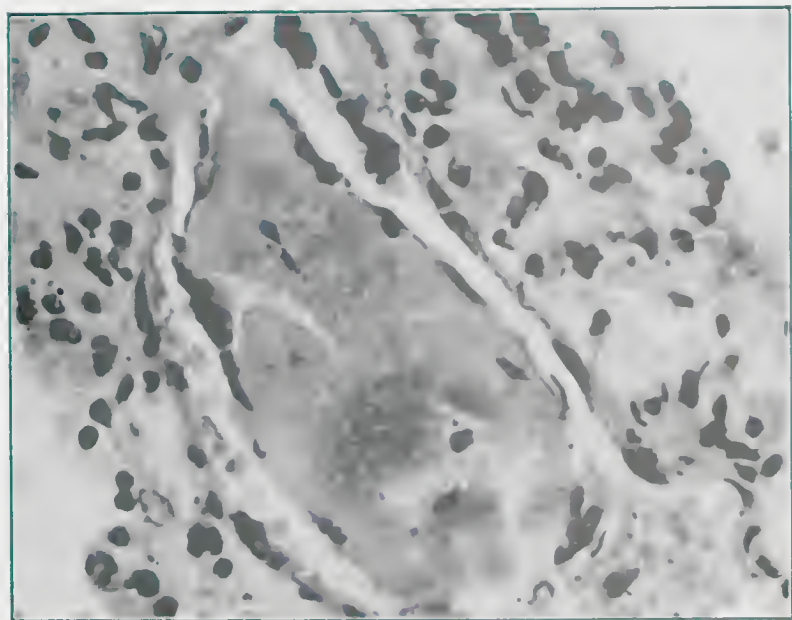



Figura n.º 17

Pulmão do coelho n.º 83-48. E' o mesmo côrte que o da figura n.º 16 mostrando a parte obliterada pelo trombo no précapilar já delimitada pelas células endoteliais. Coloração pela H. E. Microfotografia x 750. Animal injectado com 50 mgm de veneno botropico.

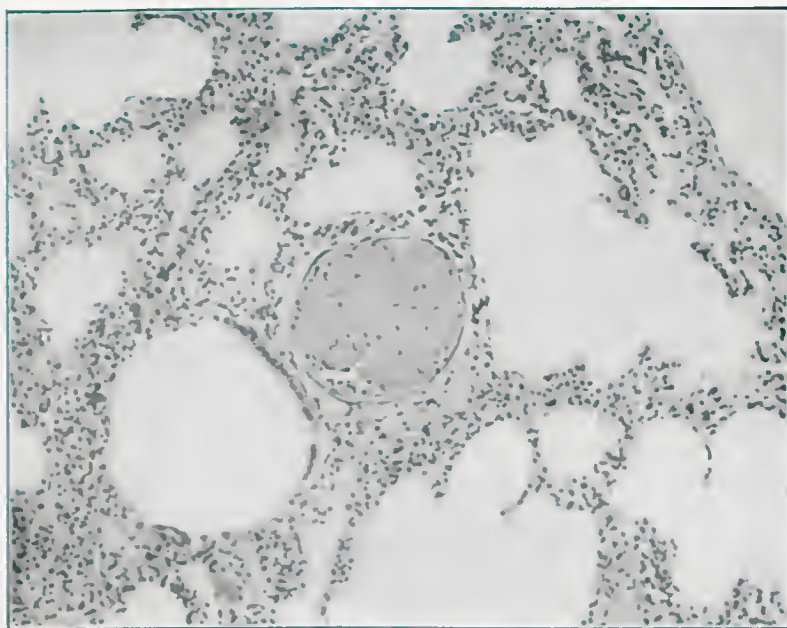



FIGURA N.° 18

Pulmão do coelho n.° 83/48 injectado com 50 μgm de veneno botrópico, mostrando uma arteríola obliterada por uma massa trombótica. Côrte histológico correspondente ao desenho colorido da figura n.° 4 com a mesma descrição. Coloração pela H. E. Microfotografia x 155. Fazer a comparação entre a figura n.° 4 e a figura n.° 18.

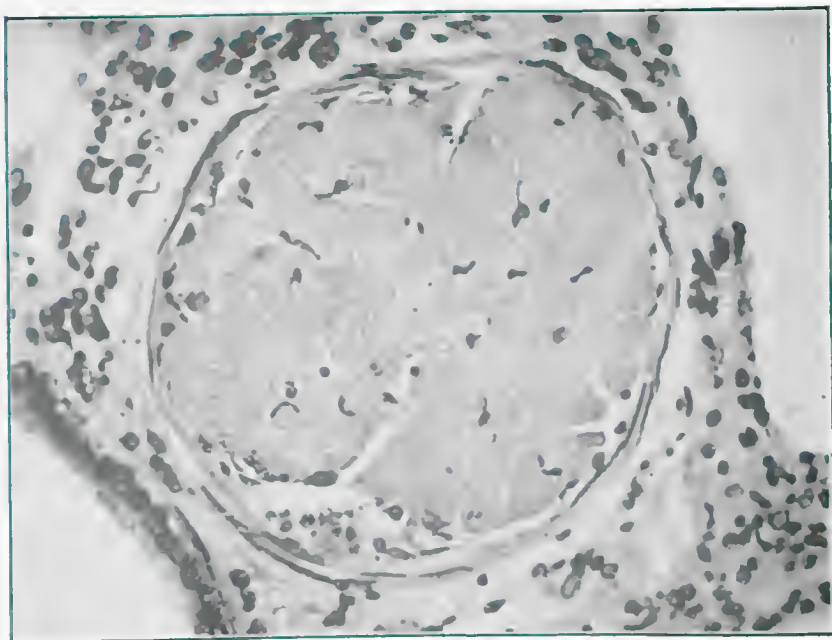



FIGURA N.° 19

É o mesmo côrte histológico da figura n.° 18, porem com uma ampliação de 460 vezes para evidenciar a massa trombótica no interior da arteriola que nos mostra na sua parede varias fibras musculares lisas. No lado esquerdo da figura, em baixo, vê-se o epitelio cilíndrico bronquiolar. Coloração pela H. E.

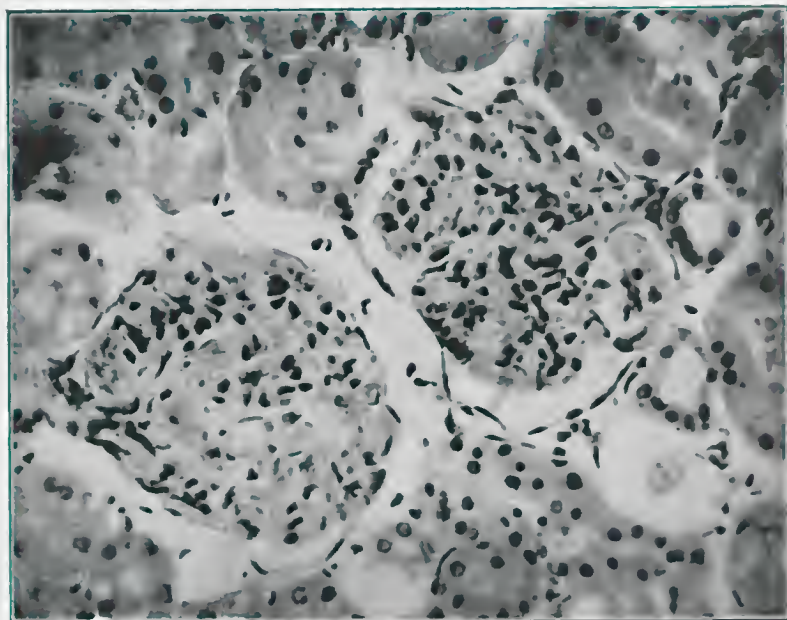



FIGURA N.º 20

Rim. Inchação turva com degeneração hidropica dos tubulos. Vêm-se dois glomerulos com a hialinização das alças e com uma pequena deposição de fibrina. Rato n.º 87-48 com 2 mgm. de veneno botrópico. Coloração pela H. E. Microfotografia x 400. Ver figura n.º 5.

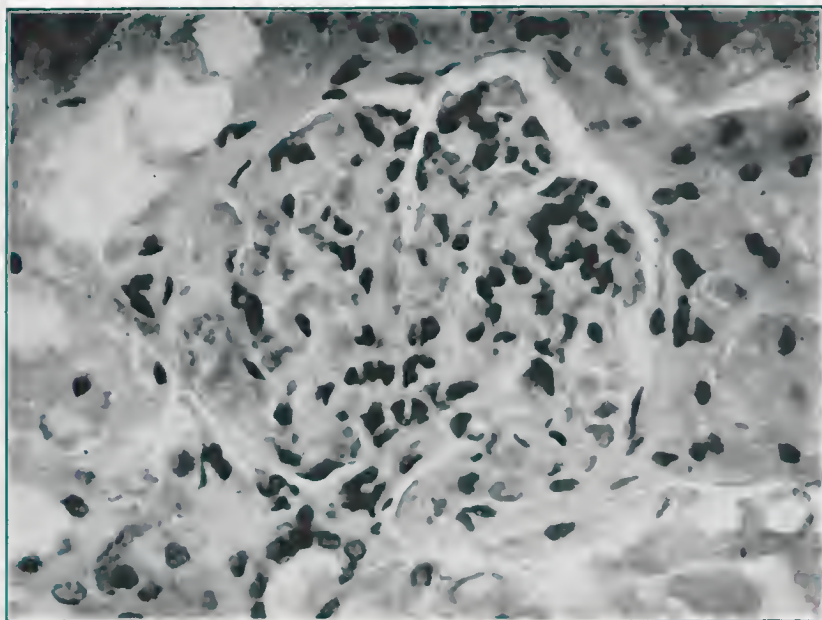



FIGURA N.º 21

Rim do rato n.º 87-48, inoculado com 2 mgm. de veneno botrópico. O glomerulo da figura apresenta uma hemorragia intracapsular à esquerda. Há no mesmo glomerulo uma deposição de fibrina e tambem uma isquemia das alças do mesmo. Coloração por H. E. Microfotografia com um aumento de 660 diametros.

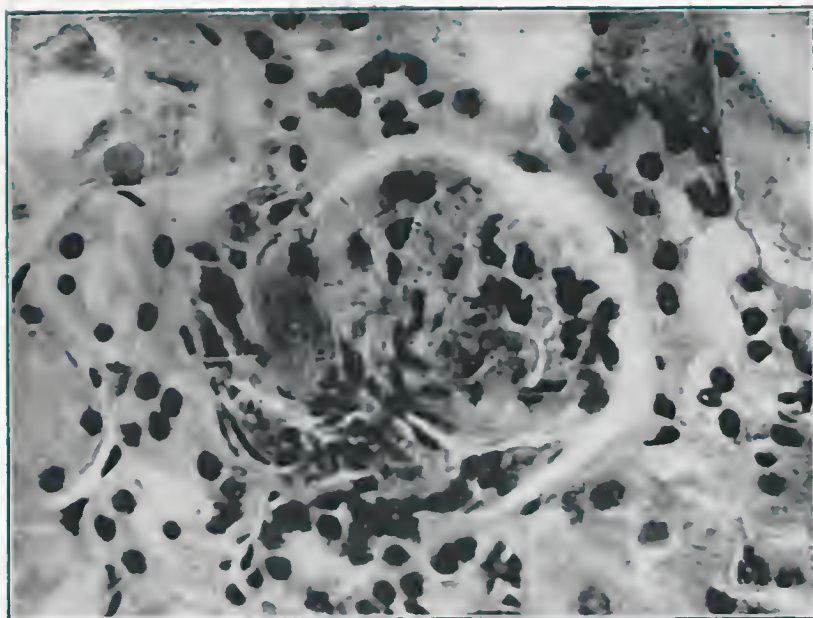



FIGURA N.º 22
Côrte histológico do rim do rato n.º 87-48, injectado com 2 mg de veneno botrópico. O glomerulo da figura mostra à esquerda, uma alça hialinizada. Também, no lado esquerdo, há uma massa de forma ovoide com o aspecto de fibrina, bem delimitada. Coloração por H. E. Microfotografia x 750.

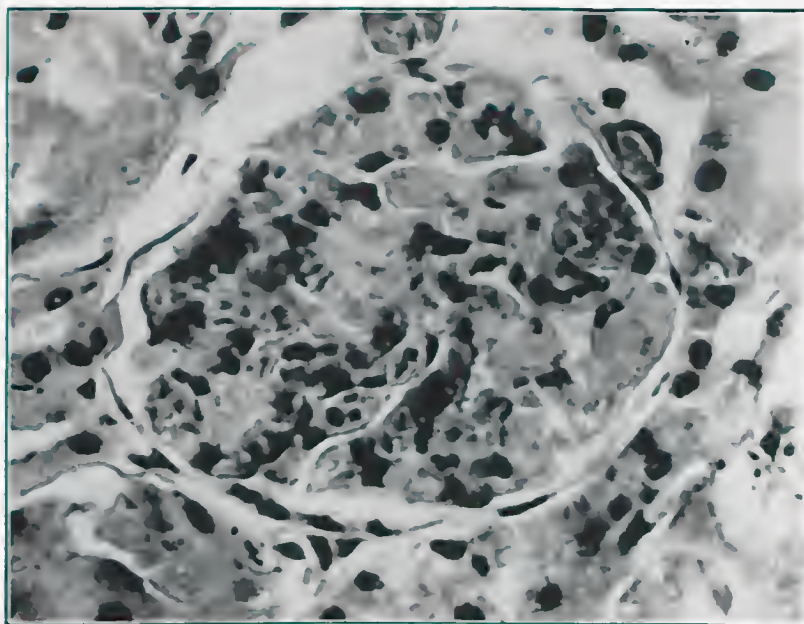



FIGURA N.º 23
Rim do Rato n.º 87-48 inoculado com 2 mg. de veneno botrópico por via subcutânea. O glomerulo acima mostra isquemia e um aumento do seu volume. À direita vê-se uma alça capilar hialinizada, contendo fibrina. O campo desta microfotografia é equivalente ao do desenho em branco e preto da figura n.º 5. Coloração por H. E. Ampliação de 750 diâmetros.

SOBRE A DISTINÇÃO GENÉRICA DOS *CROTALIDAE* (*Ophidia: Crotaloidea*) BASEADA EM ALGUNS CARACTERES OSTEOLÓGICOS

(*Nota preliminar*)

POR JOSÉ M. RUIZ

(*Secção de Zoologia Medica, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil*)

Os caracteres ósseos, em especial os craneanos, são fundamentais na estruturação da sistemática dos ofídeos. Essa sistematização, no que se refere aos crotalídeos, pode-se dizer, tem atualmente um limite que não vai alem do grupamento *familia*. A distinção especifica e, consequentemente a genérica, é feita, mormente, à base de caracteres morfológicos externos. Raros autores dão, em suas descrições específicas, caracteres osteológicos e, quando o fazem, se limitam frequentemente á enumeração dos dentes. Descrições detalhadas são encontradas esporádicamente. Estudos seriados se referem aos grandes grupos. Estudos de conjunto, para grupos específicos ou genéricos entre os crotalídeos, não existem ao que nos conste, não obstante terem sentido essa necessidade autores como Stejneger, que já em 1907 (Smith. Inst., U. S. Nat. Bull. **58**: 466) afirmara:

> "As a matter of fact, until the cranial structure of all the various forms which make up the bulk of the *Crotalidae* is known, generic combinations must be very uncertain in this family.

Essa opinião fôra emitida ao constatar certa heterogeneidade entre espécies do gênero *Trimeresurus*. Precisamente esse gênero e seu "rival" americano *Bothrops* tem sido e continua a ser um dos problemas não resolvidos da sistemática dos crotalideos. Os demais gêneros incluidos atualmente na família são diferenciados, com relativa facilidade, em base nos caracteres externos. Entretanto, pelos atuais conhecimentos, os ofiologistas sentirão dificuldade ou mesmo impossibilidade em reconhecer, pelo simples exame do crâneo, por exemplo, a posição genérica de um dado especime. Existe, sem dúvida, uma grande lacuna neste importante setor da ofiologia (ainda que não refiramos a sua repercussão na paleontologia). É quase certa a previsão de que o preenchimento gradativo

Entregue para publicação em 23 de agosto de 1951.

dessa lacuna venha trazer algumas surprezas e esclarecimentos a problemas sistemáticos hoje obscuros, que pousam sobre uma situação de conformismo.

A presente nota é um tentâme preliminar nesse sentido. Sob a forma de chave damos a diferenciação genérica dos *Crotalidae*, com base em alguns caracteres osteológicos do conjunto maxilo-palatal que, a julgar pelo material examinado, nos parecem de real valor, tais como:

1. Morfologia do maxilar (parte)
2. Morfologia do transverso ou ectopterigoide.
3. Morfologia do palatino.
4. Extensão dos dentes pterigóides.
5. Relação entre o comprimento do transverso (medida máxima, externa) e da parte basal (até o limite posterior do transverso) do pterigoide.

Não entramos na discusão desses caracteres que serão referidos com maior detalhe em próximas publicações.

CHAVE GENÉRICA DOS *CROTALIDAE* BASEADA NOS OSSOS DO CONJUNTO *MAXILO-PALATAL*

1. Osso transverso mais curto que a porção basal do pterigoide (figs. 27, 28) .... AGKISTRODON.

   Osso transverso mais longo que a porção basal do pterogóide (figs. 20 a 26) 2

2. Osso palatino em forma de forquilha, apresentando uma apófise dorsal (figs. 12 a 16). Borda da cavidade maxilar (vista antero-lateral-externa) regular, formando uma curva simples em semicirculo aberto (figs. 4, 19) .... BOTHROPS.

   Osso palatino não bifurcado como anteriormente, a porção dorsal formando uma dilatação ampla, convexa (figs 5 a 11). Borda da cavidade maxilar apresentando uma léve reentrância ou uma apófise pequena, formando duas curvaturas distintas 3

3. Dentes pterigóides ultrapassando o nivel da articulação transverso-pterigóide. Osso transverso muito forte com a parte distal ou anterior dilatada e de forma um tanto quadrangular (figs. 23, 24), ... TRIMERESURUS.

   Dentes pterigóides não ultrapassando o nivel da articulação transverso-pterigóide. Osso transverso mais delicado, não formando uma dilatação distal 4

4. Apófise da borda da cavidade maxilar lisa (figs. 1, 2, 18) .... CROTALUS e SISTRURUS.

   Apófise da borda da cavidadde maxilar apresentando uma cavidade bem diferenciada na parte externa (fig. 17) .... LACHESIS.

Pelos caracteres em apreço não é possivel distinguir os gêneros *Crotalus* e *Sistrurus*.

A presente chave é baseada no estudo de 90 crâneos, 73 por nós preparados e os demais existentes na coleção da Secção de Ofiologia do Instituto Butantan.

Serviram de base as espécies tipo de cada gênero e tantas espécies adicionais quantas nos foi possivel examinar até a presente data, conforme passamos a enumerar:

1. Gênero *Bothrops* (11 espécies):

   B. alternatus, B. atrox, B. bilineata, B. cotiara, B. hyoprora, B. insularis, B. erythromelas, B. neuwiedii, B. jararaca, B. jararacussu, B. lansbergii e *B. nasuta.*

2. Gênero *Crotalus* (11 espécies):

   C. atrox atrox, C. adamanteus, C. cerastes, C. confluentus confluentus, C. confluentus (?), *C. exsul, C. horridus, C. lepidus, C. molossus. C. triseriatus, C. terrificus terrificus* e *C. tigris.*

3. Gênero *Sistrurus* (2 espécies):

   S. catenatus catenatus e *S. miliarius.*

4. Gênero *Agkistrodon* (4 espécies):

   A. blomhoffii, A. himalayanus, A. mokasen e *A. piscivorus.*

5. Gênero *Trimeresurus* (2 espécies):

   T. gramineus e *T. wagleri.*

6. Gênero *Lachesis* (esp. única): *L. muta.*

ABSTRACT

This paper deals with the generic differentiation of the *Crotalidae,* baser on osteological characters of the maxilopalatal complex.

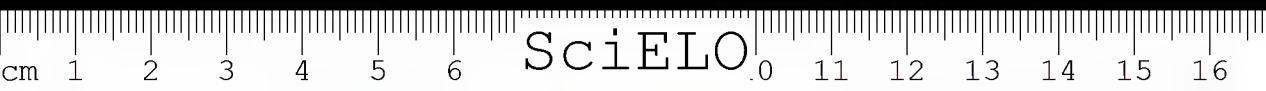
This work is based on the examination of 11 *Bothrops* species, 11 *Crotalus,* 2 *Sistrurus,* 4 *Agkistrodon,* 2 *Trimeresurus* and 1 *Lachesis.*

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

FIG. N.º

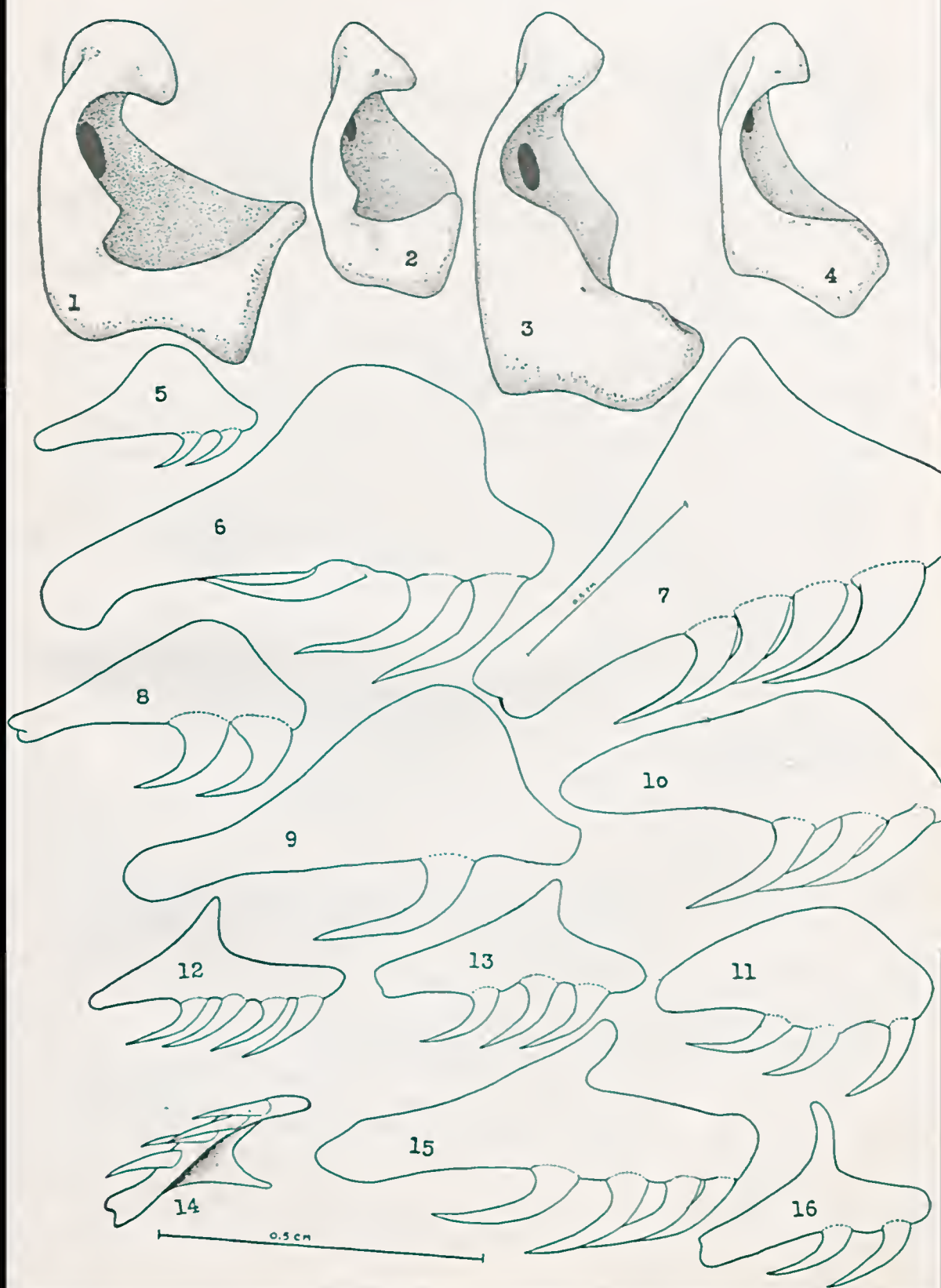
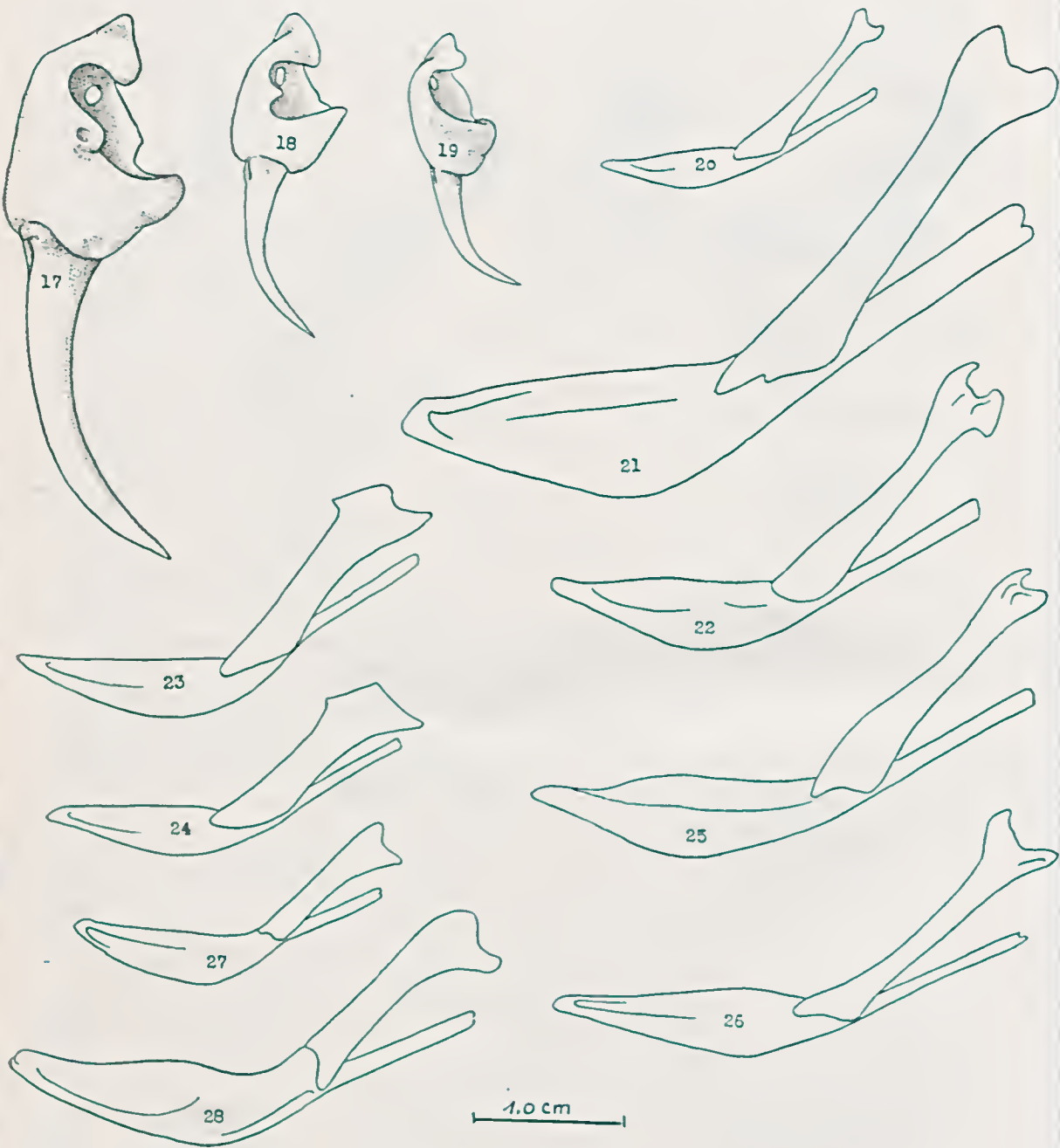
1. Maxilar de *Sistrurus catenatus catenatus*
2. " " *Sistrurus miliarius*
3. " " *Trimeresurus gramineus*
4. " " *Agkistrodon piscivorus*
5. Palatino de *Sistrurus miliarius*
6. " " *Crotalus horridus*
7. " " *Lachesis muta*
8. " " *Sistrurus catenatus catenatus*
9. " " *Crotalus terrificus terrificus*
10. " " *Trimeresurus wagleri*
11. " " *Trimeresurus gramineus*
12. " " *Bothrops jararaca*
13. " " *Bothrops cotiara*
14. " " *Bothrops jararaca* (vista anterior)
15. " " *Bothrops atrox*
16. " " *Bothrops neuwiedi*

Pl. 1.
Todos na mesma escala (exceto fig. 7). Originais.

17. Maxilar de *Lachesis muta*
18. " " *Crotalus terrificus terrificus*
19. " " *Bothrops atrox*
20. Transverso e pterigóide de *Bothrops jararaca*
21. " " " " *Lachesis muta*
22. " " " " *Crotalus terrificus terrificus*
23. " " " " *Trimeresurus wagleri*
24. " " " " *Trimeresurus gramineus*
25. " " " " *Bothrops alternata*
26. " " " " *Bothrops atrox*
27. " " " " *Agkistrodon mokasen*
28. " " " " *Agkistrodon piscivorus*

Pl. 2.
Todos na mesma escala originais.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
0.5 cm

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
1,0 cm

ON THE EPINEPHRINE — INDUCED FALL OF BLOOD EOSINOPHILS.

Action of diethylstilbestrol and the adrenolytics: 2-benzylimidazoline hydrochloride (Priscol), yohimbine and pyperidin-methyl-benzodioxane (933 F)

BY S. B. HENRIQUES, OLGA B. HENRIQUES AND LINDA NAHAS

It has been known for a long time that epinephrine injections cause an increase in the adrenal weight (1). This fact has been interpreted as a consequence of the non-specific stressing action of adrenaline (2) or of the physiological stimulation of the anterior pituitary (3). It is also known that prolonged treatment with high doses of stilbestrol causes a marked increase of the adrenal glands. Skelton, Fortier and Selye (4) observed that 1 mg of stilbestrol administered daily to rats during 10 days caused a fall of the adrenal cholesterol and ascorbic acid to 1/4 and 1/10 respectively of the control values. The production of cortical hormones by the adrenal glands is always associated with a decrease in its content of cholesterol and ascorbic acid (5). We felt that an assay of the activity of the adrenals of rats treated with diethyl-stilbestrol might throw some light on the understanding of the adrenal physiology.

This paper is both an attempt to block by adrenolytics the epinephrine-induced increase in production of cortical hormones (Experiment I), and a study of the activity of adrenal glands depleted by prolonged treatment with diethylstilbestrol (Experiment II). Since the judgement of activity of the adrenal was assessed by counting eosinophilic leucocytes, involving the analysis of data with Poisson's distribution, to which most biologists are not familiar, details of statistical analysis will also be given.

Experiment I.

INFLUENCE OF ADRENOLYTICS ON THE EPINEPHRINE-INDUCED FALL OF EOSINOPHILS.

MATERIAL AND METHODS.

Rats — 64 male white rats weighing from 120 to 160 g were distributed at random into the latin square presented in table I, the letters of which are explained in table II.

Trabalho entregue para publicação em 20 de agosto de 1951.

TABLE I

Latin square used in the experiment designed to study the influence of adrenolytics on the epinephrine-induced eosinophil fall *

Date \ Order of treatment	1	2	3	4	5	6	7	8
6.12	A	E	D	B	H	F	G	C
6.19	H	C	G	E	A	B	F	D
6.20	B	F	A	G	C	E	D	H
6.22	C	D	F	A	G	H	E	B
6.23	D	A	H	C	F	G	B	E
6.28	F	B	C	D	E	A	H	G
6.30	G	H	E	F	B	D	C	A
7.3	E	G	B	H	D	C	A	F

* For the meaning of the letters, see table II

TABLE II

Meaning of the letters of the latin square presented in table I

Inhibitors	Epinephrine Without(*)	With
Without (*) ..	A	B
Priscol	C	D
Yohimbine...	E	F
933 F	G	H

(*) *Without* — 0.9% sodium chloride was administered instead of the inhibitors or of epinephrine.

Drugs — Parke-Davis & Co. adrenaline hydrochloride, Specia's piperidin-methyl-benzodioxane (933 F), Riedel-Häen's yohimbine hydrochloride, and Ciba's "Priscol" solution.

Treatments — All animals received 2 subcutaneous injections, the second 30 minutes after the first, the latter being in a volume of 0.5 ml / 100 g of body weight while the former in 0.2 ml per 100 g. The dosages used were the following: epinephrine — 100γ, yohimbine and 933 F — 5 mg/Kg body weight and Priscol — 10 mg / Kg of body weight. All animals were bled twice from the tail for eosinophil counting, the first bleeding being done 20 minutes after the first injection and the second 4 hours after the second injection. The 64 rats, therefore, constituted the following groups of eight rats:

Group I received only 0.9% sodium chloride injections and served as absolute control. Group II received 0.9% sodium chloride in the first injection and epinephrine in the second one. Group III served as control for Priscol injections, receiving Priscol in the first injection and 0.9% sodium chloride in the second. Group IV received Priscol in the first injection and epinephrine in the second. Group V served as control for yohimbine injection, receiving yohimbine in the first injection and 0.9% sodium chloride in the second. Group VI received yohimbine in the first and epinephrine in the second injection. Group VII served as control for the 933 F, receiving 933 F in the first injection and 0.9% sodium chloride in the second. Group VIII received 933 F in the first injection and epinephrine in the second.

The eosinophilic countings were made in 1/10 dilution of the blood in Dunger's fluid in which the concentration of acetone was increased to 15% according to a modification for rat blood (6). The countings were made in a hematimetric chamber of 0.1 mm of height in which all the eosinophils present in 16 mm^2 were counted.

RESULTS

Table III presents the results for the eosinophil countings observed 20 minutes after the first injection in all animals, and table IV presents the final values observed.

TABLE III

Initial values for eosinophils in 0.16 cu. mm. of rat blood

Group	20 minutes after injection (*) of	Eosinophils in rat n.º							
		1	2	3	4	5	6	7	8
I	0.9% NaCl.	19	19	42	41	25	40	4	20
II	0.9% NaCl	18	17	60	70	24	96	8	36
III	Priscol.	25	23	18	13	10	31	8	23
IV	Priscol.	15	9	41	40	47	18	17	21
V	Yohimbine	21	32	6	95	57	64	5	21
VI	Yohimbine	61	11	4	9	13	20	26	33
VII	933 F	31	13	36	17	37	43	38	5
VIII	933 F	31	13	28	48	19	15	19	61

(*) subcutaneous in a volume of 0.5 ml/100 g of rat

TABLE IV

Final values for eosinophils in 0.16 cu. mm. of rat blood

Group	Treatment	Eosinophils in rat n.°							
		1	2	3	4	5	6	7	8
I	Two injections of 0.9% NaCl. . .	18	19	27	27	23	51	1	15
II	0.9% NaCl + Epinephrine. . . .	2	3	29	20	11	47	2	13
III	Priscol + 0.9% NaCl	18	7	3	2	7	15	7	7
IV	Priscol + Epinephrine	2	6	3	11	19	10	2	2
V	Yohimbine + 0.9% NaCl.	9	7	0	33	18	33	2	0
VI	Yohimbine + Epinephrine	25	5	4	6	0	11	5	9
VII	933 F + 0.9% NaCl	20	23	31	6	17	15	25	7
VIII	933 F + Epinephrine	25	11	12	13	11	15	4	18

The analysis of this kind of data is commonly done by calculating the percentage of fall in each animal. But this method frequently causes distortion and should be avoided (7,8). It is more correct to use the final value only, interpolating each group for the general average of initial values, by covariance analysis.

These data were submitted to covariance analysis after the transformation $\sqrt{4x + 1}$ (*). x being the different values found.

The result of this analysis can be seen in table V. Inspection of the latter shows that neither days (rows of the latin square of table I), or order of

TABLE V

Covariance analysis of results presented in table IV after the transformation $\sqrt{4x + 1}$

Source of variation	Degrees of freedom	Sums of squares and products			justed squares	Degrees of freedom	Variance
		x^2	xy	y^2			
Rows (days). . .	7	156.97	110.16	115.29	40.00	7	5.714
Columns. . . .	7	73.63	61.21	65.91	21.54	7	3.305
Treatments . .	7	75.07	27.87	121.59	117.35	7	16.764 ***
Error	42	498.88	291.06	295.92	122.59	41	2.990
Total.	63	801.55	493.30	601.71			

(***) highly significant

(*) The transformation $\sqrt{4x + 1}$ is used to transform the Poisson distribution into a normal one.

treatment, influenced the final countings. But the treatments caused a highly significant difference in the responses. Fig. I presents the 80% confidence limits (*) of the averages of the eight groups.

It can be seen that Priscol and yohimbine alone produce a fall of eosinophils and none of them inhibits the epinephrine-induced fall of eosinophils. On the other hand inspection of fig. 1 seems to indicate that a certain protection was provided by 933 F.

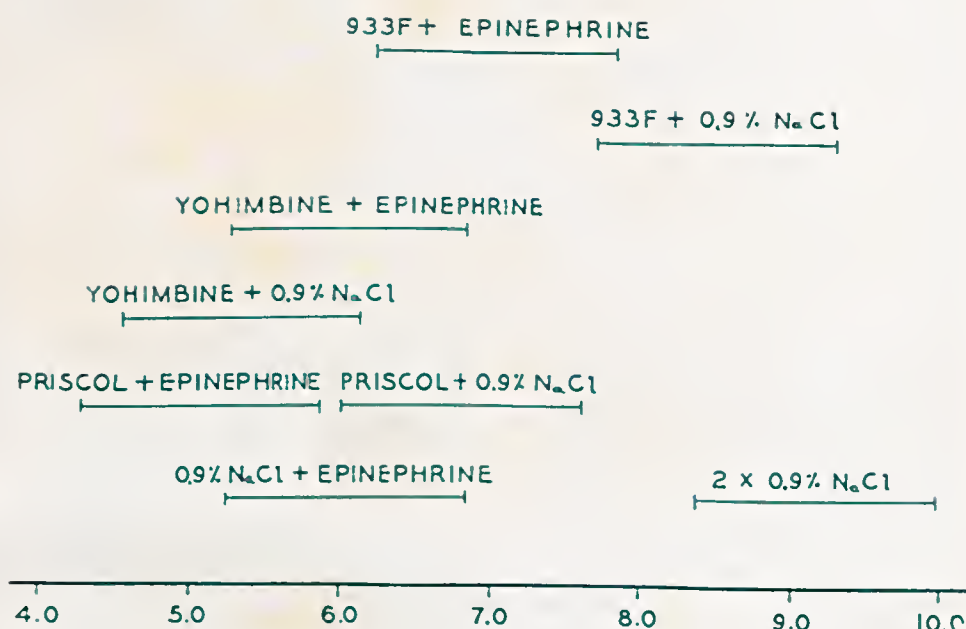



Fig. 1

80% confidence limits of final values of blood eosinophils of rats. Averages corrected by covariance analysis with initial values after the transformation $\sqrt{4x + 1}$. For interpretation see footnote of p. 119.

Therefore we repeated the experiment comparing the action of adrenaline on eosinophils in animals injected with saline with that of the same drug in animals injected with 20 mg of 933 F per Kg of body weight. The result of this experiment is presented as confidence limits of the corrected averages in table VI. It should be observed that the final values are about the double

---

(*) The use of 80% confidence limits of a set of averages is very convenient to detect statistically significant differences among them. It can be demonstrated that the probability of a difference being due to chance is at most 0.07 when the superior 80% confidence limit of the smaller average just touches the inferior confidence limit of the larger one (9).

TABLE VI

Corrected confidense limits of average final eosinophil counts of animals treated with epinephrine plus
0.9% NaCl or 933 F

Treatment	Corrected (*) 80% confidence limits	
	inferior	superior
Saline + Epinephrine	8.850	12.030
933 F + Epinephrine	9.225	12.405

(*) By covariance analysis with the initial eosinophil counting.

of those presented by fig. 1. This is due to the fact that the eosinophils present in 32 mm² were counted instead of 16 mm². It can be seen that no protection was afforded.

A B

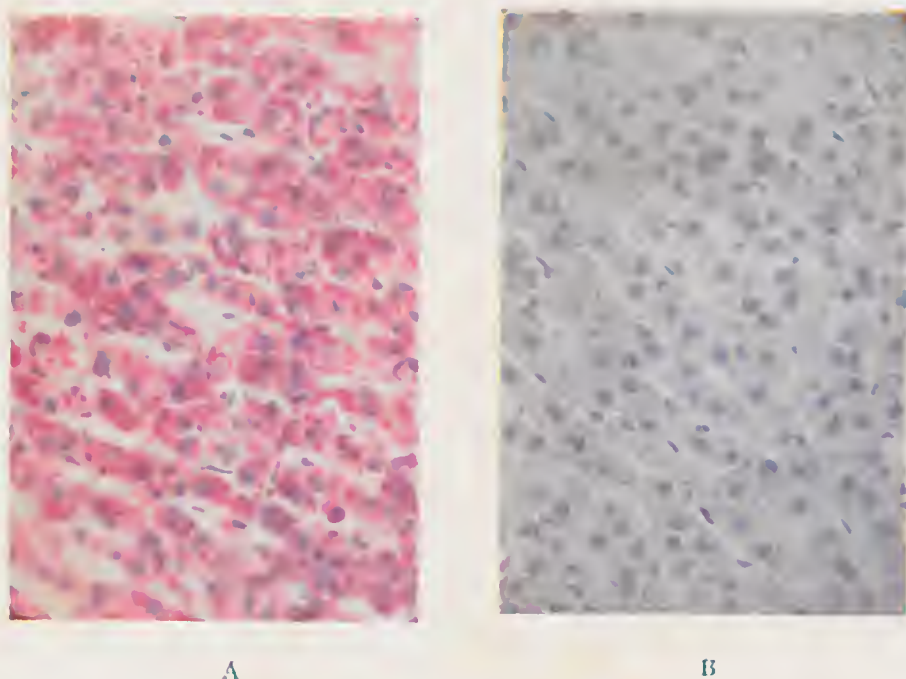



FIG. 2

Sudanophilic material of the adrenal of a normal rat (A) and of a rat treated With diethylstilbestrol (B).

Experiment II.

ACTIVITY OF ADRENAL GLANDS DEPLETED BY PROLONGED TREATMENT WITH DIETHYLSTILBESTROL.

MATERIAL AND METHODS

24 male white rats, weighing from 150 to 200 g were distributed at random into 3 groups. Group I received 1 mg of diethylstilbestrol in 0.2 ml of ethylarachidate subcutaneously. Group II served as normal control receiving 0.2 ml of ethylarachidate subcutaneously. Group III served as adrenalectomized control receiving the same treatment as group II. These injections were given daily for 14 days.

On the fiftheenth day of treatment the eosinophils of each animal were counted, and each animal received 100 γ of epinephrine dissolved in 0.2 ml per hundred grams of body weight, 4 hours later the animals were bled again and the eosinophils were counted. After that the animals were killed and at autopsy the adrenlas and thymus were removed and weighed. Histological sections of the adrenals were made and colored for adrenal lipids by Sudan III.

RESULTS

Observation of microscopic sections colored by Sudan shows a complete disappearance of sudanophilic material of the adrenals of rats treated with stilbestrol. This can be seen in a typical case presented in fig. 2.

Table VII presents other pertinent results.

TABLE VII

Adrenals, and thymus weights and adrenal activity (*) of rats treated with diethyl-stilbestrol

Treatment	Adrenals	Thymus	Final eosinophils(***)
	80 % confidence limits		
Diethyl-stilbestrol then epinephrine	(**) 37.1 — 42.9	(**) 47.9 — 87.3	12.6 — 15.6
Oil, then epinephrine .	30.1 — 35.5	168.0 — 210.9	12.0 — 15.3
Adr- Ect- T. (****) + oil, then epinephrine.	———	251.7 — 294.6	18.5 — 21.7

(*) Epinephrine-induced eosinophil fall.
(**) Absolute weight in mg.
(***) After the transformation $\sqrt{4x + 1}$ and correction by covariance anlysis.
(****) Total adrenalectomy

It can be observed, as already known, that treatment with diethylstilbestrol caused a significant increase in the weight of adrenal glands and a thymus atrophy.

As to the responsiveness of adrenals to epinephrine it can be seen that the stilbestrol-treated rats, with complete exhaustion of the sudanophilic material of the adrenal, presented final eosinophil countings equal to those of normal controls.

DISCUSSION

Previous work showed that dibenamine (10) and dihydroergocornine (11) do not block the increase in the adrenal cortex activity produced by epinephrine injections. We can see now that Priscol, yohimbine and 933 F are also unable to block this epinephrine action. As a matter of fact, in the experiment herein reported it was observed that Priscol and yohimbine produce by themselves an increase of cortical hormones secretion as detected by the eosinophil fall. This action is similar to that described for dibenamine (10).

More work is therefore needed to find an adrenolytic blocking the epinephrine-induced fall of blood eosinophils. It is to be expected that such an adrenolytic would clarify the mechanism involved in the activation of the hypophysis by adrenaline. Still more important, it might also throw light on the mechanism involved in the activation of the hypophysis by stress in general.

Our results show also that rats treated with stilbestrol for fourteen days do not present an exhaustion of the adrenals caused by overproduction of cortical hormones. This is in contradistinction to the hypothesis of Mc Phail and Read (12), which attributed the death of mice treated with stilbestrol to cortical insufficiency. Vogt's (13) comparison of the action of stilbestrol on the adrenal with the action of antithyroid substances on thyroid is also not substanciated by our results. It seems therefore, that stilbestrol, while keeping the adrenal working at high level (4) does not exhaust its capacity of responding to a superimposed stimulus, as adrenaline.

SUMMARY

1. Priscol, yohimbine and 933 F, in the amounts used, do not inhibit the fall of blood eosinophils caused by epinephrine.

2. Priscol and yohimbine cause by themselves a fall of blood eosinophils.

3. Prolonged treatment of rats with diethylstilbestrol does not induce an exhaustion of the adrenal cortex in what concerns hormonal secretion, as detected by the test of eosinophil fall.

SUMÁRIO

1. Os adrenolíticos Priscol, ioimbina e 933 F nas quantidades empregadas nêste trabalho não inhibem a queda de eosinófilos do sangue provocada pela adrenalina.

2. O Priscol e a ioimbina por si sós determinam uma queda dos eosinófilos sanguíneos.

3. Pelo teste de queda de eosinófilos, verificou-se que tratamento prolongado de ratos com dietilstilbestrol não causa exaustão das adrenais no que diz respeito à sua atividade cortical.

Acknowledgements — Our thanks are due to Prof. W. L. Stevens without whose help this work would probably not be done. Our thanks are also due to Prof. Moacyr de Freitas Amorim for the interpretation of the histological sections and to Miss Vera Mondin for their preparation.

BIBLIOGRAPHY

1. *Babes, V. & Jonescu, V.*, 1908. — In Vogt, M. — J. Physiol. **104**: 60, 1945.
2. *Selye, H.* — Stress, Montreal, Canada, Acta Inc., 1950, p. 337.
3. *Long, C. N. H.* — Rec. Progr. in Horm. Res., Proc. Laur. Horm. Conf. **1**: 99, 1946.
4. *Skelton, F. R.; Fortier, C. & Selye, H.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **71**: 120, 1949.
5. *Sayers, G. & Sayers, M. A.* — Rec. Progr. in Horm. Res., Proc. Laur. Horm. Conf. **2**: 81, 1948.
6. *Speirs, R. S. & Meyer, R. K.* — Endocrinol. **45**: 403, 1949.
7. *Finney, D. J.* — J. Hygiene **45**: 397, 1947.
8. *Henriques, S. B. & Henriques, O. B.* — Rev. Bras. Biol. **11**: 95, 1951.
9. *Stevens, W. L.* — Lecture presented at the 1st Cycle of the course on Statistics sponsored by the Brazilian Society for the Progress of Science, S. Paulo, 1950.
10. *Ronzoni, E. & Seymour, R.* — Amer. J. Physiol. **160**: 490, 1950.
11. *August, S. & Gubner, R.* — Bull. New York Acad. Medicine **25**: 446, 1949.
12. *Mc Phail, M. K. & Read, H. C.* — Anat. Rec. **84**: 75, 1942.
13. *Vogt, M.* — J. Physiol. **104**: 60, 1945.